



Production de HDL reconstituées à partir de Apolipoprotéine A-I recombinante, pour la vectorisation de molécules thérapeutiques

Sarah Rosanaly

► To cite this version:

Sarah Rosanaly. Production de HDL reconstituées à partir de Apolipoprotéine A-I recombinante, pour la vectorisation de molécules thérapeutiques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2023. Français. NNT : 2023LARE0017 . tel-04220714

HAL Id: tel-04220714

<https://theses.hal.science/tel-04220714>

Submitted on 28 Sep 2023

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

Présentée en vue de l'obtention du titre de **Docteur en Sciences à l'Université de La Réunion**

Spécialité : **Biologie médicale santé**

Unité de recherche : **Inserm UMR 1188 Diabète athérothrombose thérapies Réunion
Océan Indien**

Production de HDL reconstituées à partir d'apolipoprotéine A-I recombinante, pour la vectorisation de molécules thérapeutiques

Présentée et soutenue publiquement le 11 septembre 2023 par

Sarah ROSANALY

Composition du Jury

Dr. Cécile VINDIS	Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteuse
Dr. Thierry HUBY	Université Denis Diderot, Paris	Rapporteur
Dr. Anne-Laure MOREL	Torskal	Examinatrice
Pr. Gilles LAMBERT	Université de La Réunion	Examineur
Dr. Philippe RONDEAU	Université de La Réunion	Directeur de thèse
Dr. Joël COUPRIE	Université de La Réunion	Encadrant

A ma famille,

A mes amis,

A mon mari,

Et à mon futur rayon de soleil qui va changer à jamais ma vie.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Dr. Olivier MEILHAC**, directeur de l'Unité Mixte de Recherche 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI), qui m'a accueilli dans son unité de recherche depuis le Master et m'a permis de réaliser mes travaux de thèse dans de bonnes conditions au sein de son laboratoire. Je le remercie également pour sa bonne humeur et sa bienveillance.

Je remercie également la **Région Réunion** de m'avoir accordé un financement sur trois ans, ce qui m'a permis de mener à bien mon projet de thèse.

Je voudrais remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de juger mon travail. Un grand merci à mes deux rapporteurs, **Dr. Cécile VINDIS** et le **Dr. Thierry HUBY** ainsi qu'à mes deux examinateurs, **Dr. Anne-Laure MOREL** et **Pr. Gilles LAMBERT**.

Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, **Dr. Philippe RONDEAU** et mon encadrant, **Dr. Joël COUPRIE**, qui m'ont fait confiance et qui ont accepté de superviser ma thèse. **Philippe**, je te remercie de m'avoir toujours encouragée. Ta compréhension et ta bienveillance m'ont permis d'arriver au bout de ce travail de thèse. **Joël**, je te remercie pour ton aide, tes précieux conseils et ta bienveillance.

Mes sincères remerciements au **Dr. Pierre GIRAUD** qui m'a accompagné dans mes expérimentations pour la partie sur la surexpression depuis le Master jusqu'à la fin de ma thèse, et sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Pierre, je te remercie pour ta bonne humeur au quotidien, tes pâtisseries qui nous ont bien fait grossir, tes conseils en bricolage et j'en passe. Je te remercie de m'avoir tant appris.

Mes remerciements au **Dr. Benoit ALLARD** et au **Pr. Emmanuel BOURDON** d'avoir accepté de m'apporter leur aide pour la relecture et la correction de mon mémoire de thèse et merci à mon amie **Marie** d'avoir participé à la relecture de mon manuscrit.

Tous mes remerciements **aux membres de mon comité de thèse** pour leur bienveillance, leurs précieux conseils et leurs encouragements.

Je remercie également **Matthieu, Cynthia, Pierre, Jessica, Bryan, Wildriss** et **Laurine** qui ont participé à la réalisation de mon travail de thèse, que ce soit par leur aide technique ou scientifique.

Mes profonds remerciements à mes deux amies que j'affectionne particulièrement, **Chloé** et **Marie**, et sans qui cette aventure ne se serait pas déroulée de la même façon. Je vous remercie pour votre amitié,

pour votre présence dès que j'en ai eu besoin, pour votre bienveillance et pour tous les moments que nous avons partagés ensemble.

Mes remerciements à toutes les personnes présentes au sein de l'UMR DÉTROÏ avec qui j'ai pu partager de bons moments. Merci à **Ali, Kevin, Batoul, Stéphane, Eloïse, Janice, Valentin, Guillaume, Julien, Matthieu, Bryan, Laura, Cynthia, Danielle, Teva, Laurine, Katy, Floran, Nicolas, Steeve, Marie-Paule** et toutes les **autres personnes** que j'oublie de citer.

J'adresse mes remerciements à toutes les **personnes de la plateforme CYROI** que j'ai côtoyé et avec qui j'ai pu échanger.

J'adresse également mes profonds remerciements à **mes parents** et à mon grand frère **Gaïd. Papa et Maman**, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi et de m'avoir poussé à aller de l'avant à chaque fois. **Gaïd** je te remercie d'être chaque jour mon pilier, celui sur qui je peux me reposer. Je te remercie de me soutenir dans tous les moments. Je vous remercie tous les trois pour votre amour.

Je remercie du plus profond de mon cœur mon mari, **Fayaz**, pour son soutien sans faille. Je te remercie d'avoir été aussi patient, présent et compréhensif pendant toutes ses années. Je te remercie de m'avoir poussé à aller de l'avant.

Tous mes remerciements à ma **famille** et mes **amis** que je n'ai pas cité ici mais qui ont joué un rôle important durant ces trois années de thèse.

Et je remercie le **petit être** qui est en moi depuis peu et qui me donne le courage d'avancer chaque jour.

Table des matières

Résumé.....	9
Abstract	10
Listes des publications et communications scientifiques.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	19
Liste des abréviations	21
Introduction générale.....	29
Etude bibliographique	33
A. Les lipoprotéines.....	35
I. Découverte des lipoprotéines	36
II. Structure et fonction des lipoprotéines	37
1. Structure et classification des lipoprotéines	37
a. Classification selon la densité.....	38
b. Classification selon la mobilité électrophorétique.....	39
1. Composition des lipoprotéines	40
2. Fonctions principales de chaque classe de lipoprotéines	41
II. Métabolisme des lipoprotéines.....	43
1. La voie exogène	43
2. La voie endogène.....	44
3. Le transport inverse du cholestérol (RCT)	46
III. Physiopathologie de l'athérosclérose	46
B. Focus sur les lipoprotéines de haute densité (HDL).....	49
I. Généralités sur les HDL.....	49
1. Découverte des HDL	
2. Structure et classification des HDL	
3. Composition des HDL	54
a. Composition protéique des HDL	54
b. Composition lipidique des HDL	65
c. Les micro-ARN associés aux HDL.....	73
d. Autres composants des HDL.....	74
4. Métabolisme détaillé des HDL.....	74
a. Le transport inverse du cholestérol (RCT)	75

b.	Le métabolisme des HDL	75
II.	L'apolipoprotéine A-I.....	79
1.	Synthèse et maturation de l'ApoA-I	80
2.	Cycle de vie de l'ApoA-I	81
3.	Structure et conformations de l'ApoA-I	81
a.	L'ApoA-I monomoléculaire sans lipides	82
b.	L'ApoA-I au sein des HDL discoïdales	84
c.	L'ApoA-I au sein des HDL sphériques	85
4.	Les effets protecteurs des HDL.....	87
a.	Propriétés antiathérogènes.....	88
b.	Propriétés antithrombotiques.....	88
c.	Propriétés anti-inflammatoires	89
d.	Propriétés antioxydantes	90
e.	Propriétés anti-apoptotiques	91
5.	Les variants de l'ApoA-I	92
a.	L'ApoA-I Milano (ApoA-I _M)	92
b.	L'ApoA-I Paris (ApoA-I _P)	93
c.	L'ApoA-I A158E (ApoA-I _{AE})	93
d.	L'ApoA-I V156K (ApoA-I _{VK}).....	93
C.	La thérapie HDL : un outil prometteur	95
I.	La thérapie HDL : échecs, progrès et avenir.....	95
1.	Augmentation pharmacologique du taux de HDL-C.....	95
a.	Les statines	95
b.	Les fibrates	96
c.	La niacine.....	96
d.	Les inhibiteurs de la CETP	97
2.	Production endogène de HDL-C	99
3.	Approche thérapeutique basée sur les HDL reconstituées (rHDL)	100
a.	Les HDL sont considérées comme des nanoparticules	100
b.	Utilisation des rHDL dans les tests cliniques	102
c.	L'utilisation des rHDL dans le traitement de différentes pathologies.....	105
II.	Une nouvelle voie d'administration : la voie pulmonaire	108
1.	Généralité sur les poumons	108
2.	ApoA-I, HDL et poumons	111
3.	Pathologies pulmonaires et inflammation	114
III.	Production et caractérisation des rHDL	115

1. Les méthodes de production des rHDL	115
a. Méthode par sonication	116
b. Méthode de dialyse du cholate de sodium	116
c. Technique de la microfluidique	117
2. Les méthodes de caractérisation des rHDL	119
a. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	119
b. Microscopie électronique à transmission (MET)	120
c. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	121
d. Dichroïsme circulaire	122
Objectif de la thèse	127
Résultats expérimentaux	129
Partie I : Production, caractérisation et aérosolisation <i>in vivo</i> des nanoparticules de rHDL à partir d'ApoA-I recombinante	131
I. Introduction	131
II. Matériels et méthodes	132
III. Résultats et interprétations	139
IV. Discussion	183
V. Conclusion	187
Partie II : Enrichissement des nanoparticules de rHDL par l' α -1-antitrypsine	189
I. Introduction	189
II. Matériels et méthodes	190
III. Résultats	196
IV. Discussion	207
V. Conclusion	209
Discussion générale et perspectives	211
Références bibliographiques	217
Annexes	271

Résumé

Les propriétés bénéfiques des lipoprotéines de haute densité (HDL) sont bien reconnues pour contrer les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études cliniques montrent en effet qu'un faible taux plasmatique de HDL est associé à un développement accru de l'athérosclérose et des complications vasculaires associées. Les HDL présentent de nombreuses fonctions protectrices comme le transport inverse du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie mais également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Les fonctions protectrices multiples des HDL semblent portées par la protéine majeure, l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I). Les HDL, via leur ApoA-I, constituent de véritables nanoparticules naturelles ayant la capacité à transporter et vectoriser les molécules endogènes comme l'alpha-1-antitrypsine (AAT), une enzyme exerçant une activité protectrice pouvant réduire les processus inflammatoires impliqués dans de nombreuses pathologies vasculaires ou respiratoires. L'AAT exerce une inhibition de l'activité de protéases comme l'élastase, réduisant ainsi l'inflammation. L'ensemble des fonctions protectrices des HDL, ainsi que leur rôle de transport font d'elles des nano vecteurs d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapies.

L'objectif de ma thèse est de produire des HDL enrichies en AAT et de caractériser leurs propriétés structurales et fonctionnelles, notamment leurs activités anti-inflammatoires protectrices sur un modèle cellulaire et *in vivo* chez la souris. Grâce aux nanoparticules (rHDL) produites, mon travail a également visé l'exploration de voies d'administration originales comme l'inhalation pour le traitement des pathologies vasculaires ou pulmonaires.

Pour répondre à ces objectifs, l'ApoA-I recombinante (rApoA-I) fusionnée à une étiquette histidine clivable a été produite au sein de la bactérie *Clear coli*. Après clivage de l'étiquette et purification par chromatographie d'affinité, la caractérisation de rApoA-I a été réalisée par électrophorèse SDS-PAGE, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Les rHDL ont été constituées selon un protocole utilisant du cholate de sodium, en combinant l'ApoA-I purifiée et caractérisée avec de la phosphatidylcholine selon un ratio molaire 1 : 75. Les techniques de diffusion dynamique de la lumière et de microscopie électronique ont permis de déterminer une taille des rHDL d'environ 7 nm et une morphologie similaire aux pré-β-HDL naturelles.

La caractérisation fonctionnelle sur des cellules endothéliales (EA.hy926) et épithéliales (A549) montre une capacité d'internalisation rapide des rHDL tout en préservant la viabilité cellulaire. De plus, une diminution de l'expression de la cytokine IL-6 et de la molécule d'adhésion ICAM-1 par les EA.hy926 incubées avec les rHDL atteste de leur capacité anti-inflammatoire et de protection endothéliale.

In vivo, le test de biodisponibilité effectué chez la souris C57BL/6, révèle une bonne captation des rHDL par les poumons, 6 h après leur administration par aérosolisation.

L'enrichissement des nanoparticules avec de l'AAT a démontré que même en présence d'un enrichissement modeste des rHDL, celles-ci présentent, *in vitro*, des activités anti-inflammatoires et de protection de l'endothélium significatives ainsi qu'une activité anti-élastase notable.

Ces résultats montrent que les rHDL produites à partir d'ApoA-I recombinante présentent des effets protecteurs. La répartition homogène des rHDL au sein des poumons et l'absence de cytotoxicité permettent d'envisager leur utilisation dans le traitement de maladies inflammatoires pulmonaires telles que l'emphysème pulmonaire. De plus, l'enrichissement des rHDL avec l'AAT a permis de montrer que l'activité anti-élastase de l'enzyme nécessaire à son rôle anti-inflammatoire était préservée.

Ainsi, les résultats de mon travail de thèse apportent des éléments de validation importants pour la préparation et l'utilisation des rHDL comme nano vecteurs de composés thérapeutiques administrables par voie pulmonaire.

Mots clés : HDL, lipoprotéines, apolipoprotéine A-I nanoparticules, vectorisation, alpha-1-antitrypsine, aérosolisation, anti-inflammatoire

Abstract

The beneficial properties of high-density lipoproteins (HDL) in the reduction of cardiovascular diseases are well recognized. Several clinical studies have shown that low plasma HDL levels are associated with the development of atherosclerosis and vascular complications. HDL exhibits several protective functions, such as the reverse cholesterol transport from peripheral tissues to the liver, as well as antioxidant and anti-inflammatory properties. The multiple protective functions of HDL appear to be carried out mainly by the lipoprotein's major protein component, apolipoprotein A-I (ApoA-I). HDL, via ApoA-I, are also natural nanoparticles with the ability to transport and vectorize numerous endogenous molecules such as alpha-1-antitrypsin (AAT), an enzyme with protective activity that can reduce the inflammatory processes involved in numerous vascular and respiratory pathologies. AAT inhibits the activity of proteases such as elastase, thereby reducing inflammation. All the protective functions of HDL, as well as their transport role, make these particles interesting nano-vectors for the development of new therapies.

The aim of my thesis is to produce HDLs enriched with AAT, and to characterize their structural and functional anti-inflammatory properties, in an *in vitro* cell culture model and *in vivo* mouse model. In addition, the nanoparticles produced have been used to explore novel routes of administration such as inhalation, a highly targeted route for the treatment of vascular or pulmonary pathologies.

To achieve these objectives, a recombinant ApoA-I (rApoA-I) was fused to a cleavable histidine tag in the bacterial strain *Clear coli*. After cleavage of the tag and purification by affinity chromatography, rApoA-I was characterized by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The rHDL were prepared following a protocol using sodium cholate dialysis by combining purified and characterized ApoA-I with phosphatidylcholine in a 1:75 molar ratio. Dynamic light scattering and electron microscopy techniques revealed that the nanoparticles obtained were about 7 nm in size and had a morphology similar to the natural pre- β -HDL. Functional characterization on endothelial (EA. hy926) and epithelial (A549) cells showed rapid internalization of rHDL while preserving cell viability. In addition, EA. hy926 incubated with rHDL showed a decrease in the expression of the cytokine IL-6 and the adhesion molecule ICAM-1, attesting the anti-inflammatory and endothelial protection capacity of nanoparticles.

In vivo, the bioavailability test performed on C57BL/6 mice revealed good uptake of rHDL nanoparticles by the lungs, 6 h after their administration by aerosolization.

Enrichment of nanoparticles with AAT showed that even in the presence of modest enrichment, rHDL exhibited significant anti-inflammatory and endothelium-protecting activities, as well as significant anti-elastase activity, *in vitro*.

In conclusion, my results showed that rHDL produced from recombinant ApoA-I exhibit protective effects. The homogeneous distribution of rHDL within the lungs and the absence of cytotoxicity suggest that they could be used to treat inflammatory lung diseases such as pulmonary emphysema. In addition, enrichment of rHDL with AAT showed that the enzyme's anti-elastase activity was preserved, a prerequisite for its anti-inflammatory role. Thus, the results of my thesis work provide important validation elements for the preparation and use of rHDL as nano-carriers for therapeutic compounds administered via the pulmonary route.

Keywords : HDL, lipoproteins, apolipoprotein A-I, nanoparticles, vectorization, alpha-1-antitrypsin, aerosolization, anti-inflammatory

Listes des publications et communications scientifiques

Publications faisant directement l'objet de ce travail

Rosanaly, S., Apalama, ML., Bringart, M., Couprie, J., Giraud, P., Meilhac, O., Allard, B., & Rondeau, P. Production, characterization and aerosolization of therapeutic high density lipoproteins-like with or without histidine tagged recombinant ApoA-I (En préparation).

Publications associées à ce travail

Narra, S. S., **Rosanaly, S.**, Rondeau, P., Patche, J., Veeren, B., Gonthier, M.-P., Viranaicken, W., Diotel, N., Ramanan, P., Hellencourt, C. L. d', & Meilhac, O. (2022). ApoA-I Nanoparticles as Curcumin Carriers for Cerebral Endothelial Cells : Improved Cytoprotective Effects against Methylglyoxal. *Pharmaceuticals*, 15(3), 347. <https://doi.org/10.3390/ph15030347>

Publications des travaux collaboratifs

Dobi, A., **Rosanaly, S.**, Devin, A., Baret, P., Meilhac, O., Harry, G. J., d'Hellencourt, C. L., & Rondeau, P. (2021). Advanced glycation end-products disrupt brain microvascular endothelial cell barrier : The role of mitochondria and oxidative stress. *Microvascular Research*, 133, 104098. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104098>

Safadi, D. E., Lebeau, G., Lagrave, A., Mélade, J., Grondin, L., **Rosanaly, S.**, Begue, F., Hoareau, M., Veeren, B., Roche, M., Hoarau, J.-J., Meilhac, O., Mavingui, P., Desprès, P., Viranaïcken, W., & Krejbich-Trotot, P. (2023). Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection. *Viruses*, 15(2), 364. <https://doi.org/10.3390/v15020364>

Communications par affiches lors de congrès

Rosanaly S., Giraud P., Couprie J., Meilhac O., Rondeau P.

"Production of rHDL nanoparticles for therapeutic treatments of atherosclerosis complications."

17 ème congrès de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose, Juin 2022, Biarritz, France

Liste des figures

Figure 1 : Les différents composants du sang.....	35
Figure 2 : Schéma représentatif de la structure d'une lipoprotéine.....	30
Figure 3 : Distribution de la densité des lipoprotéines en fonction du diamètre des particules.....	31
Figure 4 : Lipoprotéinogramme d'un sujet normolipidémique obtenu après électrophorèse du sérum en gel d'agarose et coloration par le Noir Soudan.....	39
Figure 5 : Structure du cholestérol, d'un triglycéride et d'un phospholipide (PC).	41
Figure 6 : Schéma représentatif des différents types lipoprotéines.....	42
Figure 7 : La voie exogène.....	44
Figure 8 : La voie endogène	45
Figure 9 : Processus du développement de l'athérosclérose	47
Figure 10 : Evolution de la recherche sur la biologie des HDL	50
Figure 11 : Schéma de la structure d'une HDL mature	51
Figure 12 : Classification des différentes sous-classes de HDL en fonction de leur forme, leur densité et leur taille, leur mobilité électrophorétique, et leur composition en apolipoprotéine	52
Figure 13 : Caractérisation des HDL par ultracentrifugation analytique	53
Figure 14 : Structure d'un phospholipide et nomenclature abrégée des chaînes d'acides gras	67
Figure 15 : Structure des phospholipides.....	69
Figure 16 : Structure d'un sphingolipide	70
Figure 17 : Cholestérol et estérification du cholestérol catalysée par l'ACAT ou la LCAT	72
Figure 18 : Les miRs transportés par les HDL et leur impact	74
Figure 19 : Métabolisme des HDL et transport inverse du cholestérol	79
Figure 20 : Production et processus de maturation de l'ApoA-I au sein du foie et de l'intestin	80
Figure 21 : Les trois formes d'ApoA-I existantes dans le plasma	82
Figure 22 : Structure cristallisée de l'ApoA-I humaine à l'état non lipidé de la forme pleine et de la forme tronquée de 43 résidus.....	83
Figure 23 : Deux modèles de conformation de l'ApoA-I au sein des HDL discoïdales	84
Figure 24 : Vues de dessus et de côté des 10 conformères d'ApoA-I tronquée au sein de particules HDL discoïdales	85
Figure 25 : Structure de l'ApoA-I humaine au sein d'une HDL sphérique	86
Figure 26 : Les HDL physiologiques présentent de nombreuses fonctions protectrices qui peuvent être altérées en situation pathologique	87

Figure 27 : Les principaux types de nanoparticules polymériques connues sous le nom de nanosphère (système matrice) et nanocapsule (système réservoir)	100
Figure 28 : Schéma représentatif d'une rHDL vecteur de molécules thérapeutiques.....	102
Figure 29 : Anatomie du poumon (issue du centre de transplantation d'organe : Anatomie et physiologie).	109
Figure 30 : Description cellulaire du compartiment et des capillaires alvéolaires	110
Figure 31 : Composition lipidique et protéique du surfactant alvéolaire	111
Figure 32 : Expression des transporteurs ABC dans les cellules alvéolaires	113
Figure 33 : Flux laminaire de deux substances colorées au sein d'une puce microfluidique et production de microgouttelettes.....	118
Figure 34 : Schéma de la méthode de reconstitution de rHDL par microfluidique	118
Figure 35 : Représentation schématique du principe de la diffusion dynamique de la lumière	120
Figure 36 : Représentation schématique du fonctionnement de la microscopie électronique à transmission	121
Figure 37 : Représentation schématique du principe de la chromatographie d'exclusion de taille ..	122
Figure 38 : Représentation schématique du principe du dichroïsme circulaire	123
Figure 39 : DC de l'ApoA-I en solution et de différentes préparations de rHDL obtenus à partir d'ApoA-I en présence de différents phospholipides	123
Figure 40 : Schéma du plasmide pET28a à codons optimisés conçu par GeneCust pour la transformation bactérienne et la surexpression de l'ApoA-I recombinante.....	132
Figure 41 : Les différentes étapes de la production de l'Apolipoprotéine A-I recombinante et de la production de nanoparticules de rHDL	133
Figure 42 : Principe de la chromatographie d'affinité HisTrap pour la purification de l'ApoA-I	135
Figure 43 : Principe de la chromatographie d'affinité HisTrap après clivage du Tag.....	137
Figure 44 : Procédure de production des nanoparticules de rHDL à partir de His-rApoA-I ou rApoA-I et de phospholipides (POPC)	138
Figure 45 : Mise en culture et sélection des bactéries transformées avec les plasmides d'intérêt ...	140
Figure 46 : Vérification sur gel SDS PAGE 12 % de la surexpression protéique de la forme sauvage et mutantes de l'ApoA-I.....	141
Figure 47 : Purification de l'ApoA-IWT recombinante par chromatographie d'affinité en utilisant deux méthodes d'élution	142
Figure 48 : Profil d'élution gradient par palier en imidazole des mutants de l'ApoA-I par chromatographie d'affinité	143
Figure 49 : Clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV	144
Figure 50 : Purification de l'ApoA-IWT après clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV... ..	145

Figure 51 : Analyse de la taille des nanoparticules de rHDL par DLS.	146
Figure 52 : Analyse par DLS de la taille des nanoparticules de rHDL reconstituées à partir de différents ratios de protéines:phospholipides.....	147
Figure 53 : Profil de purification des rHDL obtenues avec différents ratios rApoA-I:POPC par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superose 6 Increase.....	148
Figure 54 : Schéma expérimental du test de biodisponibilité préliminaire avec le CSL-111	181
Figure 55 : Les HDL marquées au Dil-C18 sont détectables dans les poumons de souris 6 heures après l'instillation	182
Figure 56 : Les étapes de la production de nanoparticules enrichies (rHDLAAT).....	190
Figure 57 : Les différentes colonnes de gel filtration utilisées pour l'élimination de l'AAT libre	191
Figure 58 : Principe de la méthode de dosage de l'inhibition de l'activité élastase.....	193
Figure 59 : Purification de rHDLAAT par ultracentrifugation et analyse des fractions de la purification sur gel SDS-PAGE 12 %	196
Figure 60 : Purification des rHDLAAT par différentes colonnes de gel filtration et analyse des fractions d'élution par Western Blot.....	197
Figure 61 : Profil de purification des His-rHDLAAT par chromatographie d'affinité sur une colonne HisTrap.....	199
Figure 62 : Les His-rHDL sont enrichies en AAT et présentent une bonne taille	200
Figure 63 : Dosage par densitométrie de la quantité d'AAT présente dans les His-rHDLAAT	201
Figure 64 : Les nanoparticules de His-rHDLAAT inhibent l'activité de l'élastase	202
Figure 65 : Captation des nanoparticules de His-rHDLAAT par les cellules EA.hy926	202
Figure 66 : Suivi en temps réel du comportement cellulaire EA.hy926 en réponse à l'élastase neutrophile (NE) en absence ou en présence de His-rHDL _{AAT}	203
Figure 67 : Les nanoparticules de His-rHDLAAT protègent l'altération de la morphologie induite par l'élastase neutrophile	204
Figure 68 : Les nanoparticules de His-rHDLAAT limitent la fragmentation de l'ADN induite par l'élastase neutrophile.....	205
Figure 69 : His-rHDLAAT limite l'activation endothéliale et l'inflammation des cellules EA.hy926 induites par le TNF α	206
Figure 70 : Principe du couplage peptidique entre l'octadecylamine et le Sivelestat.....	215

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et compositions des différentes classes de lipoprotéines	38
Tableau 2 : Composition en apolipoprotéines des différentes classes de lipoprotéine	40
Tableau 3 : Composants protéiques majeurs des HDL	56
Tableau 4 : Composants lipidiques majeurs des HDL	66
Tableau 5 : Utilisation des inhibiteurs de la CETP dans la thérapie HDL	97
Tableau 6 : Expression cellulaire des transporteurs ABC dans les poumons de mammifères	113
Tableau 7 : Quantités de réactifs utilisées en fonction du ratio protéine:phospholipides	139

Liste des abréviations

AAA	Anévrisme de l'Aorte Abdominale
AAT	Alpha-1-AntiTrypsine
ABC	ATP-Binding Cassette (cassette de liaison à l'adénosine triphosphate)
Ac-225	Actinium-225ACAT
ACAT	Acyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase
ACCELERATE	Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
AIM-HIGH	Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes
ApoA-I	Apolipoprotéine A-I
ApoA-I_{AE}	Apolipoprotéine A-1 A158E
ApoA-I_M	Apolipoprotéine A-I Milano
ApoA-I_P	Apolipoprotéine A-I Paris
ApoA-I_{VK}	Apolipoprotéine A-I V156K
ATF3	Activating Transcription Factor 3 (facteur de transcription activateur 3)
ATP	Adénosine Triphosphate
ARNi	ARN interférant
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BCA	BiCinchoninic Acid assay
BET	Bromodomain and Extra-Terminal proteins (protéines à bromodomaine et extra-terminales)
BPCO	BronchoPneumopathie Chronique Obstructive

CD	Cluster of Differentiation (classe de différenciation)
CD (partie C.III.2.d.)	Circular Dichroism (dichroïsme circulaire)
CETP	Cholesteryl Ester Transfer Protein (protéine de transfert des esters de cholestérol)
CHO	Chinese Hamster Ovary (ovaires de hamster de Chine)
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEFINE	Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib
DGAT	Diacylglycérol Transferase
DLS	Dynamic Light Scattering (diffusion dynamique de la lumière)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPC	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphocholine
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycérol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eNOS	Oxyde Nitrique Synthase Endothéliale
FAK	Focal Adhesion Kinase (kinase d'adhérence focale)
FATP4	Fatty Acid Transport Protein 4 (protéine 4 de transport des acides gras à longue chaîne)
GSL	Glycosphingolipides
HDL	High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HDL-C	HDL cholestérol
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme A
HPS2-THRIVE	Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events

HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (cellules endothéliales de veines ombilicales humaines)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (molécule d'adhésion intercellulaire 1)
IDL	Intermediate Density Lipoprotein (lipoprotéine de densité intermédiaire)
IFNg	Interféron gamma
IL	Interleukine
ILLUMINATE	Investigation of Lipid Level Management to Understand its IMpact IN ATtherosclerotic Events
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KBr	Bromure de potassium
KO	Knock-Out
LB	Luria Broth
LCAT	Lécithine-Cholestérol Acyl Transférase
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de basse densité)
LDLR	LDL-receptor (récepteur des LDL)
LOC	Lab-On-Chip (laboratoire sur puce)
LOOHs	Lipides hydroperoxides
LPCAT	Lysophosphatidylcholine Acyl-Transférase
Lp(a)	Lipoprotéine (a)
LPL	Lipoprotéine Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	LDL-Receptor Related Protein (protéine liée au récepteur des LDL)
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 (protéine chimiotactique des monocytes 1)

MEB	Microscopie Électronique à Balayage
MET	Microscopie Électronique à Transmission
MGAT	Monoacylglycerol Acyltransferase
miR	MicroARN
MPO	Myéloperoxydase
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein (protéine microsomale de transfert des triglycérides)
NE	Élastase Neutrophile
NF-kB	Nuclear Factor Kappa B (facteur nucléaire kappa B)
NO	Nitric Oxide (oxyde nitrique)
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like-1
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGI2	Prostacycline
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLTP	Protéine de Transfert des Phospholipides
POPC	1-palmitoyl-2-oléoyl-glycéro-3-phosphocholine
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes)
RCT	Reverse Cholesterol Transport (transport inverse du cholestérol)

REVEAL	Randomized evaluation of the effects of anacetrapib through lipid modification
rHDL	Reconstituted High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité reconstituée)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
SAA	Amyloïde Sérique A
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium)
SEC	Size-Exclusion Chromatography (chromatographie d'exclusion de taille)
SL	Sphingolipides
SM	Sphingomyéline
SOC	Super Optimal Broth
SR	Scavenger Receptor
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (transducteur de signal et activateur de la transcription 3)
TEN	Tris NaCl EDTA
TEV	Tobacco Etch Virus
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha (facteur de nécrose tumorale)
TUNEL	Terminal transferase dUTP nick-end
UA	Unité Arbitraire
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1)

VDL	Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéine de très basse densité)
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (récepteur 2 du facteur de croissance endothéliale vasculaire)
WT	Wild Type (type sauvage)

Introduction générale

Les lipoprotéines constituent des complexes macromoléculaires importants pour le transport et l'homéostasie des lipides (cholestérol et triglycérides). Il existe différentes sous-classes de lipoprotéines définies en fonction de leur densité et de leur composition. En considérant le ratio lipides/protéines, les lipoprotéines peuvent être classées des moins denses aux plus denses : chylomicrons, lipoprotéines de très basse densité (VLDL), lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), lipoprotéines de basse densité (LDL) et lipoprotéines de haute densité (HDL). Chacune des lipoprotéines présentes dans le plasma possède une fonction spécifique. Cependant, un déséquilibre dans la répartition des différentes lipoprotéines est caractéristique d'une dyslipidémie qui peut conduire à un risque accru de développement des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

Les HDL sont les lipoprotéines les plus denses et les plus petites dans le plasma et sont généralement désignées comme le bon "cholestérol". Car des niveaux élevés de concentrations plasmatiques de cette lipoprotéine contribuent à réduire les événements cardiovasculaires liés à l'athérosclérose car elles participent à empêcher la formation de plaques athérosclérotiques. Cette propriété protectrice est liée à sa principale fonction de transport vers le foie de l'excès de cholestérol accumulé dans les tissus périphériques pour en assurer son élimination ou son recyclage. En plus de cette fonction de transport inverse du cholestérol (RCT, "Reverse Cholesterol Transport"), les HDL présentent des effets pléiotropes anti-inflammatoire, anti-oxydants, anti-apoptotiques et anti-thrombotiques conférés par sa composante protéique majeure qui est l'apolipoprotéine A-I ou ApoA-I.

Les HDL constituent de véritables nanoparticules naturelles dans la circulation sanguine, en transportant dans tout l'organisme de nombreuses molécules telles que des hormones, des vitamines ou des protéines endogènes. Ces propriétés spécifiques expliquent le fort intérêt porté aux HDL depuis plusieurs années pour véhiculer, cibler et délivrer plus efficacement les agents thérapeutiques. Les HDL peuvent transporter différentes protéines exerçant des activités protectrices participant à la réduction des processus inflammatoires survenant dans de nombreuses pathologies. Parmi les protéines qu'elles transportent, figure l'alpha-1-antitrypsine (AAT), une protéine de la phase aiguë, dont la fonction principale est de protéger les tissus contre l'activité de la sérine protéase, plus spécifiquement celle de l'élastase. L'élastase est une sérine protéase importante dans la défense de l'hôte, cependant, son action active l'inflammation. Cette sérine protéase est donc liée aux processus pathologiques de nombreuses maladies inflammatoires notamment les pathologies pulmonaires (emphysème pulmonaire ...). Pour les raisons mentionnées précédemment, l'approche thérapeutique à base de HDL apparaît être une voie d'exploration pertinente dans le traitement des complications

associées à l'athérosclérose, mais également dans d'autres pathologies inflammatoires ayant un impact important sur la santé humaine telles que les maladies pulmonaires.

Au cours des 50 dernières années, de nombreuses méthodes ont été mises en place afin d'obtenir des HDL et de les utiliser à des fins thérapeutiques. La méthode classique consiste à isoler par ultracentrifugation les HDL à partir de plasma. Après déprivation en lipides, des HDL *in vitro* sont produites via l'enrichissement de la particule résiduelle riche en ApoA-I avec des molécules thérapeutiques d'intérêt. Cependant, l'isolation des HDL à partir de plasma s'avère très contraignante, c'est pourquoi des méthodes de génie génétique ont été développées afin de pouvoir produire de l'ApoA-I recombinante pour ensuite reconstituer des nanoparticules de lipoprotéine de haute densité reconstituée (rHDL, "Reconstituted High Density Lipoprotein") à partir de de l'ApoA-I et de phospholipides.

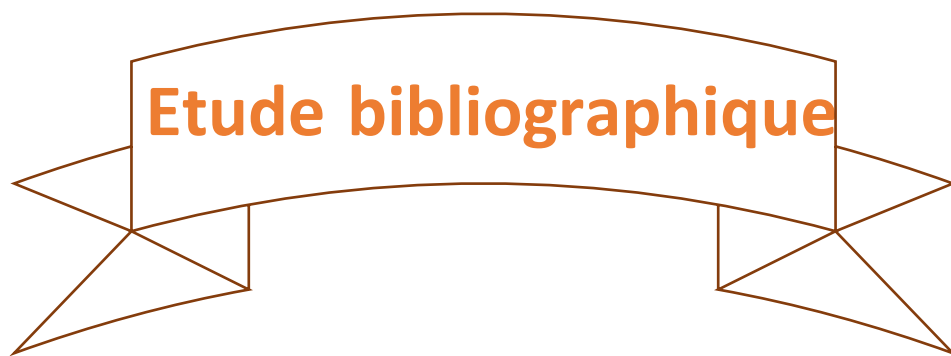
L'objectif de ma thèse est donc de produire des nanoparticules de rHDL à partir d'ApoA-I recombinante pour vectoriser des molécules d'intérêt thérapeutique.

Pour répondre à cet objectif, j'ai tout d'abord mis au point la surexpression de l'apolipoprotéine A-I recombinante en utilisant un système bactérien *Clear coli* afin d'obtenir de grandes quantités de protéines pures que j'ai ensuite utilisées dans la reconstitution de nanoparticules de rHDL de taille contrôlée. Les propriétés protectrices de ces nanoparticules reconstituées ont ensuite été évaluées sur des cellules endothéliales et épithéliales *in vitro* préalablement à une de leur biodisponibilité *in vivo* chez la souris. Dans l'optique de vectoriser par la suite des molécules d'intérêt thérapeutique par les nanoparticules de rHDL, celles-ci ont été enrichies avec de l'AAT et ensuite caractérisées sur des cellules endothéliales *in vitro*.

Mon mémoire de thèse débute par une étude bibliographique apportant tout d'abord une large description des lipoprotéines, de leur composition, de leur métabolisme ainsi que leur implication dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Les différents aspects des HDL incluant la structure, le métabolisme, les propriétés intrinsèques ainsi que le rôle de l'ApoA-I sont ensuite abordés. La dernière partie de mon étude bibliographique se concentre sur le développement des thérapies HDL, avec l'utilisation des rHDL et des différentes méthodes employées pour leur production et leur caractérisation.

Ensuite, les objectifs de la thèse seront détaillés, suivi de mes travaux de thèse qui se présentent à en deux grandes parties.

La première partie porte sur la production de rHDL fonctionnelles à partir l'ApoA-I recombinante, et ses tests de biodisponibilité chez la souris. L'enrichissement des nanoparticules de rHDL avec de l'AAT et les tests de fonctionnalité sont abordés dans la deuxième partie.



A. Les lipoprotéines

Le plasma est le composant liquide du sang et il constitue 55 % du volume sanguin total (Figure 1). Il est obtenu par centrifugation du sang. Composé de 92 % d'eau, de sels, d'hormones et de vitamines, le plasma est particulièrement riche en protéines (dont l'albumine, sa protéine principale), en immunoglobulines, en facteurs de coagulation, en fibrinogène et en lipides (Mathew et al., 2022).

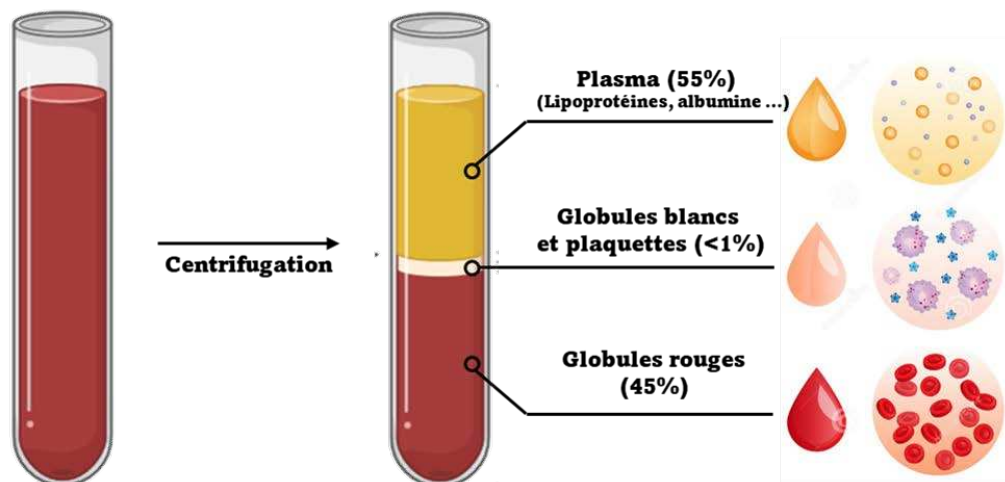


Figure 1: Les différents composants du sang

Les lipides, principalement les triglycérides et le cholestérol, sont des composants essentiels de l'organisme et sont transportés par la circulation sanguine. Les triglycérides servent de substrats énergétiques en particulier dans les muscles mais également dans le foie et les tissus périphériques. Ils sont stockés dans les tissus adipeux et constituent la principale réserve énergétique de l'organisme. Le cholestérol, quant à lui, sert de composant pour les membranes cellulaires, de précurseur des stéroïdes surrénaliens et gonadiques et des acides biliaires hépatiques (Lent-Schochet & Jialal, 2022).

Cependant, les propriétés hydrophobes des lipides rendent compliquée leur circulation dans les milieux aqueux tels que le sang, la lymphe et le liquide interstitiel. Pour pouvoir être transportés dans la circulation sanguine, ces lipides sont pris en charge par des particules ayant un revêtement de molécules amphipathiques (présentant à la fois des surfaces hydrophobes et hydrophiles) qu'on appelle les lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont des complexes macromoléculaires stables et hydrosolubles. Elles ont donc pour rôle de transporter les molécules lipidiques hydrophobes afin de les rendre solubles dans les milieux. Pour cela, les lipides vont se complexer à des protéines amphiphiles qu'on appelle apolipoprotéines.

I. Découverte des lipoprotéines

La première hypothèse de l'existence d'un système de transport des graisses dans le sang chez l'animal a été émise par Boyle en 1665. En effet, il a noté qu'à la suite d'un repas gras, les lactés des animaux avaient une apparence laiteuse et que cette émulsion rentrait par la suite dans la circulation sanguine par le canal thoracique. En 1774, Henson a montré que ce liquide à l'aspect laiteux contenait de la graisse. Par la suite, Gage et Fish ont montré en 1924, qu'à la suite d'un repas gras, le sang humain pouvait contenir de minuscules particules d'environ 1 μm de diamètre qu'ils ont nommées chylomicrons (Olson, 1998).

Le cholestérol, les phospholipides et d'autres fractions lipidiques n'existent pas à l'état libre dans la circulation. En effet, ils sont combinés entre eux et avec des protéines sous la forme de lipoprotéines de poids moléculaires élevées. Ceci explique pourquoi les lipides ne peuvent pas être extraits complètement du plasma avec de l'éther (Russ et al., 1951). En 1929, des lipoprotéines stables et hydrosolubles ont été isolées pour la première fois à partir de sérum de cheval par Michel Macheboeuf (Russ et al., 1951; Olson, 1998; Kingwell et al., 2014). Ces particules correspondent à des lipoprotéines de haute densité (HDL), composées de 59 % de protéines et 41 % de lipides dont 18 % de cholestérol et 23 % de phospholipides (Olson, 1998).

Ensuite, les méthodes de fractionnement des protéines développées par Cohn et ses collaborateurs ont permis de séparer efficacement les formes alpha et bêta des lipoprotéines et de démontrer que la quasi-totalité du cholestérol du plasma était contenue dans ces deux formes de lipoprotéines (Cohn et al., 1950). Les travaux d'Oncley ont montré qu'environ 25 % du cholestérol total est contenu dans les alpha lipoprotéines et que le reste se trouve dans les bêta lipoprotéines. Avec son équipe, Oncley a également découvert en 1950 les lipoprotéines de basse densité (LDL) dans le plasma humain. L'analyse chimique de ces LDL a permis d'établir leur composition avec 23 % en protéines, 30 % en phospholipides, 8 % en cholestérol libre et 39 % en cholestérol estérifié (Oncley et al., 1950). Par la suite, la présence d'un éventail de lipoprotéines comprenant les VLDL, LDL et les HDL a été mise en évidence par ultracentrifugation.

En 1963, la lipoprotéine humaine (a) [Lp(a)] a été découverte pour la première fois par un médecin norvégien Kare Berg lors d'une étude conçue pour détecter les variations antigéniques du LDL humain. Depuis sa découverte, cette particule intrigue de nombreux chercheurs en raison de sa fonction physiologique inconnue et de son association avec les maladies coronariennes (Berg, 1963; K. Schmidt et al., 2016).

II. Structure et fonction des lipoprotéines

1. Structure et classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules globulaires complexes ressemblant à des micelles. Comme déjà évoqué, elles transportent des protéines et des lipides dans le plasma, en particulier les triglycérides et les esters de cholestérol. Ces lipides sont des molécules hydrophobes et non polaires qui constituent le noyau des lipoprotéines. Ce noyau hydrophobe est enveloppé par une monocouche amphipathique constituée de phospholipides, de cholestérol libre et d'apolipoprotéines (Figure 2) (Feingold, 2000).

L'orientation de la tête polaire des phospholipides vers l'extérieur et de la queue apolaire vers l'intérieur permet aux lipoprotéines de maintenir une stabilité tout en étant soluble. Les apolipoprotéines localisées à la surface, sont des régulateurs essentiels du transport des lipides et facilitent également la solubilisation des lipides par leurs propriétés amphiphiles (Ginsberg, 1998).

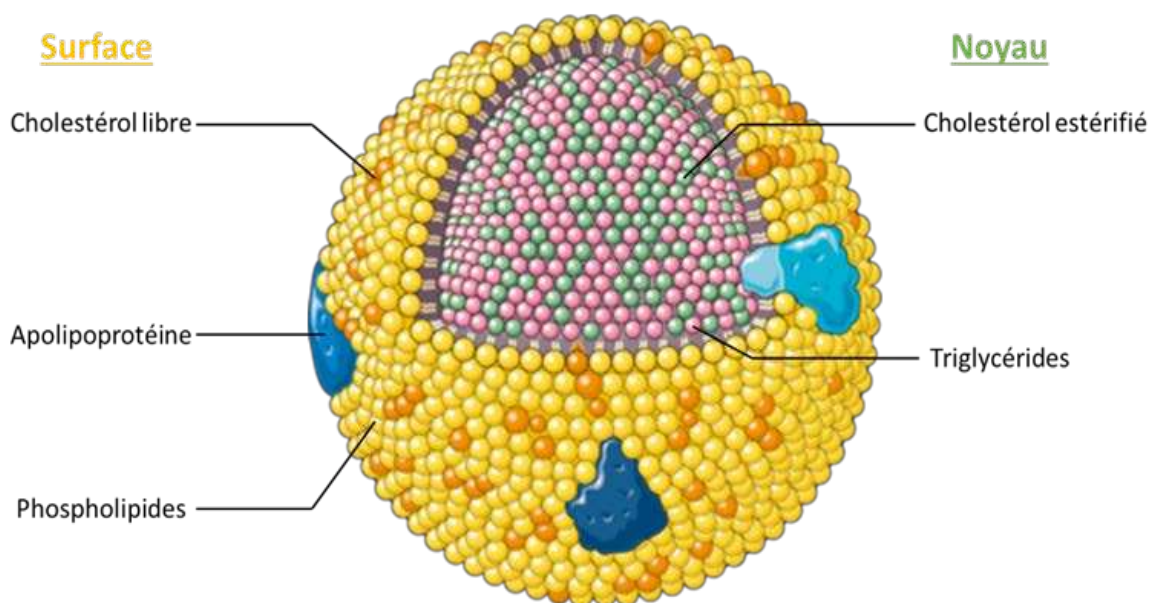


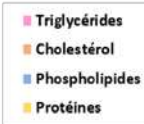
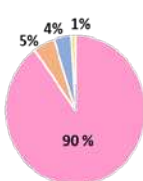
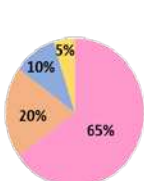
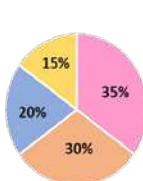
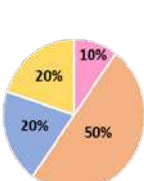
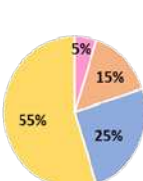
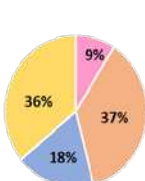
Figure 2 : Schéma représentatif de la structure d'une lipoprotéine.

Plusieurs grandes classes de lipoprotéines ont été définies par leurs caractéristiques physico-chimiques, telles que la densité, la taille, la mobilité électrophorétique et la composition en lipides et en apolipoprotéines (R. Mahley et al., 1985; Deepthi, 2018). Les lipoprotéines peuvent être isolées par diverses méthodes physiques telles que l'ultracentrifugation qui permet de les séparer selon la densité et l'électrophorèse sur gel d'agarose qui permet une séparation selon leur charge électrique et leur taille/forme. C'est pour cette raison que la classification des lipoprotéines se fait selon ces deux critères: la densité et la mobilité électrophorétique.

a. Classification selon la densité

La densité des lipoprotéines dépend de leur proportion lipidique et protéique qui peut être très variable. Les protéines ayant une densité plus élevée que les lipides, la densité des lipoprotéines est par conséquent proportionnelle à la teneur en protéines et inversement proportionnelle à leur taille et leur teneur en lipides. Les caractéristiques physico-chimiques des principales classes de lipoprotéines sont présentées dans le [Tableau 1](#) (Ginsberg, 1998).

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques et compositions des différentes classes de lipoprotéines (adapté de Ginsberg, 1998; Olson, 1998).

Composition des lipoprotéines	Chylomicrons	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
						
Masse moléculaire (Da)	400×10^6	$10-80 \times 10^6$	$5-10 \times 10^6$	2.3×10^6	$1,7-3,6 \times 10^5$	$2,75-8 \times 10^5$

En prenant en compte la densité et la taille, les lipoprotéines sont divisées en sept classes : les chylomicrons, VLDL, IDL, LDL, HDL et Lp(a) ([Figure 3](#)).

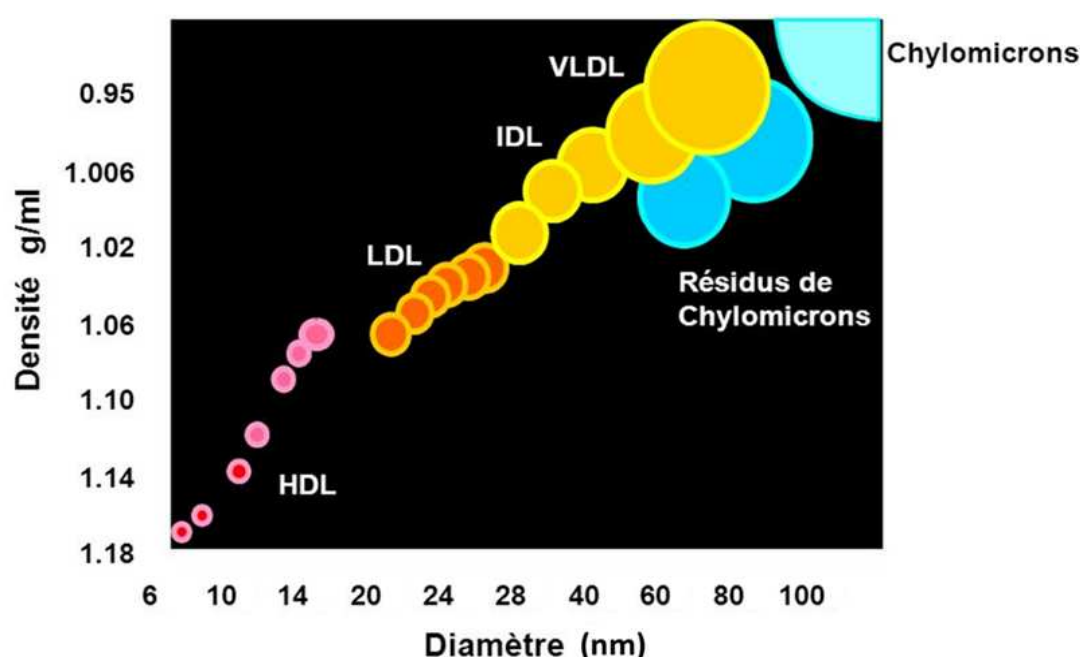


Figure 3 : Distribution de la densité des lipoprotéines en fonction du diamètre des particules (adapté de [slideplayer.fr](#)).

b. Classification selon la mobilité électrophorétique

Les différentes classes de lipoprotéines peuvent être séparées selon leur mobilité électrophorétique par électrophorèse sur gel d'agarose (Jean Dallongeville, 2006). En effet, les lipoprotéines à faible teneur en protéine migrent plus lentement par rapport à celles à forte teneur en protéines. Il existe 4 types de lipoprotéines classés selon leur mobilité électrophorétique croissante : les alpha lipoprotéines (α) comprenant les HDL qui ont une teneur élevée en protéines, les bêta lipoprotéines (β) regroupant les LDL, pré-bêta lipoprotéines (pré- β) incluant les VLDL et les chylomicrons (Figure 4) (Lewis, 1973).

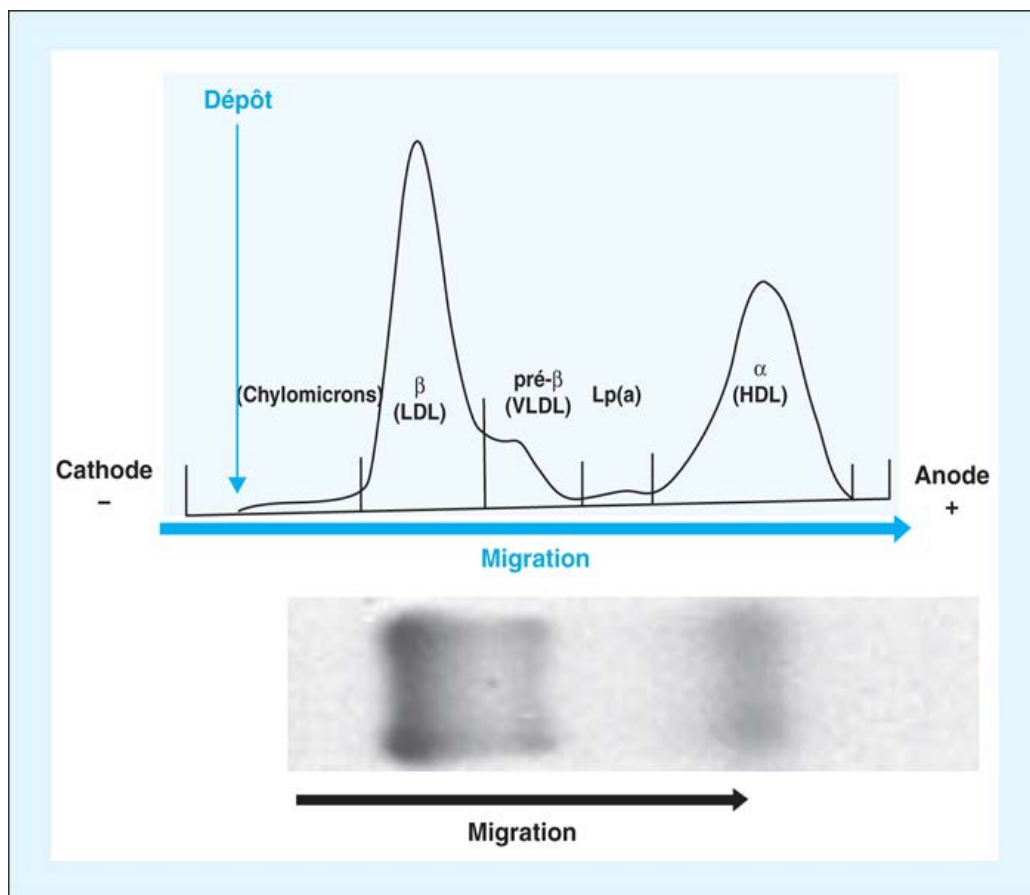


Figure 4 : Lipoprotéinogramme d'un sujet normolipidémique obtenu après électrophorèse du sérum en gel d'agarose et coloration par le Noir Soudan. HDL: lipoprotéines de haute densité; LDL: lipoprotéines de basse densité; VLDL: lipoprotéines de très basse densité; Lp(a): lipoprotéine(a) (d'après Bittar et al., 2020).

La teneur en apolipoprotéines est également un critère qui permet de classer les lipoprotéines. En effet, les apolipoprotéines majoritaires telles que l'ApoB-100 et l'ApoA-I permettent de classer les lipoprotéines en deux catégories : les lipoprotéines à ApoB (ApoB-48 et ApoB-100) et les lipoprotéines à ApoA. Les chylomicrons, VLDL, IDL, LDL et Lp(a) sont principalement constitués d'apolipoprotéine B tandis que les HDL sont principalement constituées d'apolipoprotéine A (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition en apolipoprotéines des différentes classes de lipoprotéine (traduit de Feingold, 2000).

Lipoprotéine	Lipides majeurs	Apolipoprotéines majeures
Chylomicrons	Triglycérides	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV
Reste de chylomicrons	Triglycérides Cholestérol	B-48, E
VLDL	Triglycérides	B-100, E, C
IDL	Triglycérides Cholestérol	B-100, E, C
LDL	Cholestérol	B-100
HDL	Cholestérol Phospholipides	A-I, A-II, C, E
Lp(a)	Cholestérol	B-100, (a)

1. Composition des lipoprotéines

Toutes les classes de lipoprotéines sont constituées de cinq composants principaux : des triglycérides et des esters de cholestérol dans le noyau hydrophobe, et des phospholipides, du cholestérol libre et des apolipoprotéines sur la couche externe (Figure 5). Les triglycérides sont les principaux lipides constitutifs des chylomicrons et des VLDL. Ils sont produits au niveau du foie ou absorbés au niveau de l'intestin grêle pour les triglycérides provenant de l'alimentation. Ils servent de substrats énergétiques aux tissus périphériques, en particulier aux muscles, et peuvent également être stockés dans les tissus adipeux pour la réserve d'énergie. Dans le plasma, les triglycérides sont hydrolysés en acides gras.

Le cholestérol est un composant essentiel dans notre organisme. Sa production endogène est réalisée majoritairement par le foie mais aussi par d'autres cellules comme les cellules intestinales, mais il peut également provenir de l'alimentation. Au sein des lipoprotéines, le cholestérol est présent au niveau du noyau hydrophobe sous forme estérifiée ou bien à la surface sous forme libre. Il joue un rôle central dans de nombreux processus tels que la composition des membranes cellulaires, la synthèse des hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de la vitamine D.

La surface d'une grande partie des lipoprotéines est constituée d'une monocouche de phospholipides. Ils agissent comme une interface entre les composants polaires de la couche externe et les composants non polaires du noyau hydrophobe. La phosphatidylcholine (PC) est la principale composante phospholipidique du plasma, de la membrane des cellules de mammifères et par conséquent des

lipoprotéines. Une carence sévère en phospholipides réduit la formation et la sécrétion des VLDL par le foie (Ginsberg, 1998; Taylor et al., 2007).

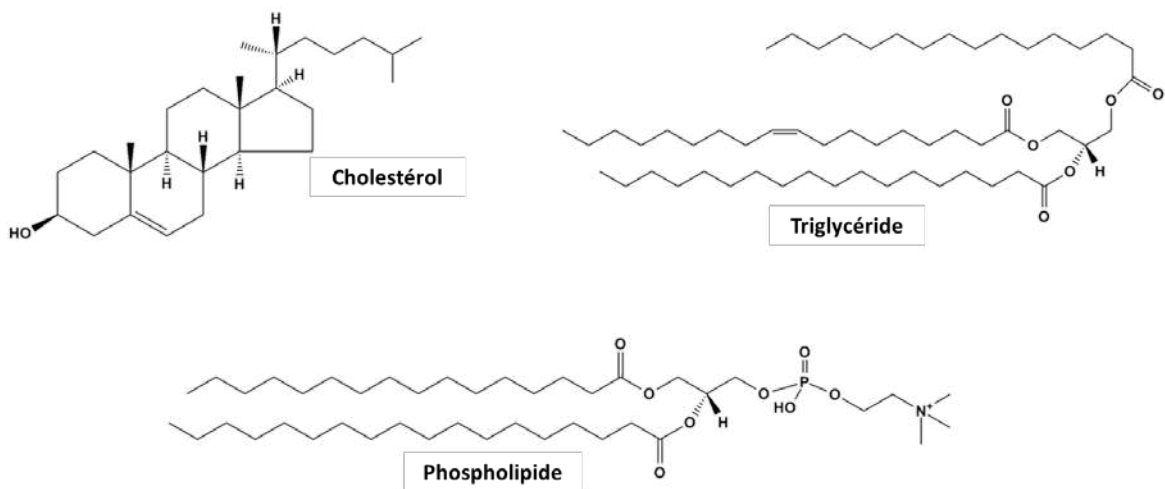


Figure 5 : Structure du cholestérol, d'un triglycéride et d'un phospholipide (PC).

Présentes également à la surface des lipoprotéines, les apolipoprotéines ont quatre fonctions principales. Elles assurent la stabilité structurale de la lipoprotéine et agissent également comme ligands pour des récepteurs. Elles jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines et servent d'activateurs et d'inhibiteurs de nombreuses réactions. Certaines apolipoprotéines agissent comme cofacteurs pour les enzymes plasmatiques modificatrices des lipides (Feingold, 2000).

2. Fonctions principales de chaque classe de lipoprotéines

Toutes les lipoprotéines présentes dans la circulation ont chacune des fonctions spécifiques. Les **chylomicrons** sont les lipoprotéines les plus grosses (1000 nm) et les moins denses (< 0,93 g/mL) (Figure 6). Ce sont de grandes particules riches en triglycérides produites par les entérocytes à partir des lipides alimentaires. Ils participent au transport des triglycérides alimentaires et du cholestérol vers les tissus périphériques et le foie. Ces particules contiennent de nombreuses apolipoprotéines : A-I, A-II, A-IV, A-V, B-48, C-II, C-III et E. L'Apo B-48 est la protéine structurale centrale et chaque particule de chylomicron contient une molécule d'Apo B-48 (Ginsberg, 1998; Lent-Schochet & Jialal, 2022; Rahmany & Jialal, 2022).

Les **VLDL** sont produites par le foie et sont également riches en triglycérides. Elles transportent les triglycérides endogènes produits dans le système hépatobiliaire principalement vers les muscles (C.-K. Lee et al., 2021). Les VLDL sont aussi constituées de nombreuses apolipoprotéines : B-100, C-I, C-II, C-III et E. L'Apo B-100 est la protéine structurale centrale et chaque particule de VLDL contient une molécule d'Apo B-100. Les VLDL sont plus petites que les chylomicrons. L'élimination des triglycérides

des VLDL entraîne la formation de particules résiduelles enrichies en cholestérol, les IDL. Les **IDL** sont des particules intermédiaires de plus petites tailles riches en ApoE. L'hydrolyse des IDL par la lipase hépatique réduit à nouveau leur taille pour former les LDL (Ginsberg, 1998; Feingold, 2000).

Les **LDL** sont obtenues à partir de l'hydrolyse des particules de VLDL et d'IDL et sont les principaux transporteurs de cholestérol dans le sang. Elles sont synthétisées par le foie à partir des VLDL et ont pour fonction de transporter le cholestérol depuis le foie vers les tissus périphériques. L'apolipoprotéine prédominante des LDL est l'ApoB-100 et chaque particule en contient une. Les LDL sont reconnues pour être des marqueurs importants des maladies cardiovasculaires, et sont considérées comme les lipoprotéines les plus athérogènes (Hirayama & Miida, 2012).

Les **HDL** sont des petites particules plus denses enrichies en cholestérol et en phospholipides. Elles jouent un rôle important dans le transport inverse du cholestérol (RCT, "Reverse Cholesterol Transport"). Ce terme est utilisé pour décrire la voie par laquelle le cholestérol présent dans les tissus périphériques est transféré, via le plasma, vers le foie pour être soit recyclé, soit excrété de l'organisme dans la bile. C'est par ce mécanisme que les HDL sont connues pour avoir un effet antiathérogène. Les HDL ont également de nombreuses fonctions protectrices qui seront détaillées par la suite (Feingold, 2000; Shih et al., 2009; Fisher et al., 2012).

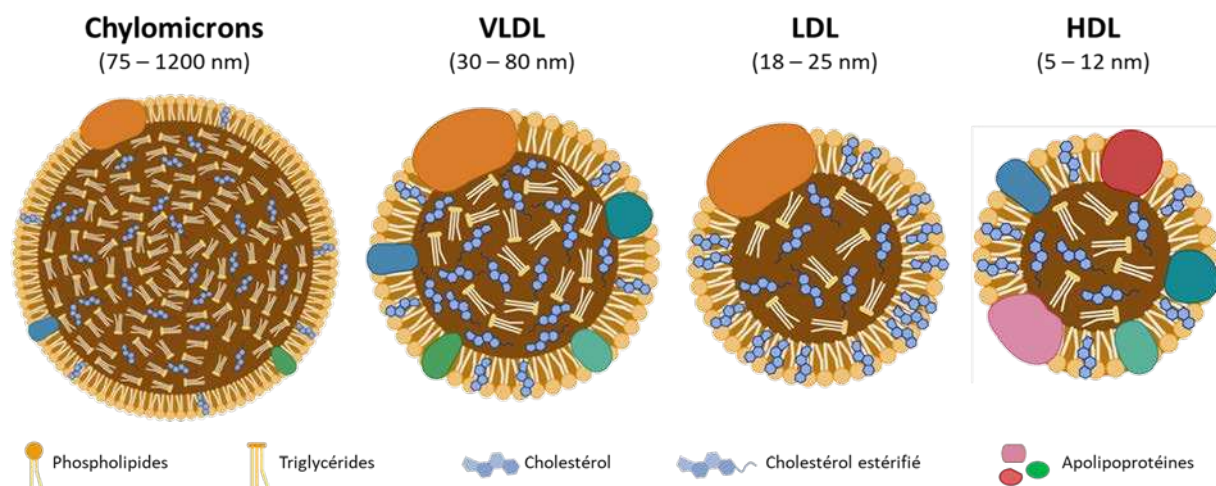


Figure 6 : Schéma représentatif des différents types lipoprotéines.

II. Métabolisme des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines se divise en trois voies principales : la voie exogène, la voie endogène et le transport inverse du cholestérol (RCT). Les lipides proviennent de sources exogènes, comme l'alimentation, ou de source endogène, comme la synthèse par le foie.

1. La voie exogène

La voie exogène des lipoprotéines débute au niveau de l'intestin (Figure 7). Les lipides alimentaires, principalement les triglycérides, sont transportés vers le foie et le tissu adipeux par les chylomicrons formés au niveau des cellules intestinales pendant le période post-prandiale. Les triglycérides alimentaires (environ 100 grammes par jour) sont hydrolysés en acides gras libres et en monoacylglycérol par les lipases intestinales puis émulsionnés avec des acides biliaires, du cholestérol, des stérols végétaux et des vitamines liposolubles pour former des micelles solubles qui sont essentielles à leur absorption par les entérocytes.

Le cholestérol, les stérols végétaux, les acides gras, le monoacylglycérol et les vitamines liposolubles contenus dans les micelles sont ensuite transportés dans les cellules intestinales via la protéine Niemann-Pick C1-Like-1 (NPC1L1). NPC1L1 est une protéine exprimée dans la membrane apicale à l'interface entérocyte/lumière intestinale (Wang et al., 2017). Cette protéine facilite l'absorption du cholestérol et des stérols végétaux de la lumière intestinale vers les entérocytes. Une fois dans la cellule intestinale, le cholestérol et les stérols végétaux peuvent être transportés dans la lumière intestinale via un processus médié par les transporteurs de cassettes de liaison à l'adénosine triphosphate : ABCG5 et ABCG8 ("ATP-binding cassette") (Kidambi & Patel, 2008). Ils peuvent également être convertis en esters de stérol par l'acyl-CoA cholestérol acyl transférase (ACAT), une enzyme permettant l'estérification des acides gras par les stérols.

Les acides gras, quant à eux, sont absorbés soit par diffusion passive, soit au niveau des entérocytes via des transporteurs protéiques tels que CD36 ("cluster of differentiation 36", classe de différenciation 36) et FATP4 ("fatty acid transport protein 4", protéine 4 de transport des acides gras). Une fois absorbés, les acides gras participent à la synthèse de triglycérides avec les monoacylglycerols. Les enzymes impliquées dans cette synthèse sont la MGAT (monoacylglycerol acyltransferase) et la DGAT (diacylglycérol transferase). Les triglycérides et les esters de cholestérol sont transportés dans le réticulum endoplasmique par la MTP ("microsomal triglyceride transfer protein", protéine microsomale de transfert des triglycérides) pour servir à l'assemblage des chylomicrons. Cette fabrication nécessite la synthèse de la principale apolipoprotéine de structure des chylomicrons,

l'ApoB-48, par les cellules intestinales. Les chylomicrons sont alors sécrétés dans le système lymphatique intestinal et délivrés dans la circulation via le canal thoracique. Une fois entrés dans la circulation, les chylomicrons sont maturés en assimilant les apolipoprotéines C (C-I, C-II, C-III), A (A-I, A-II, A-V) et l'ApoE à la surface des HDL. L'acquisition de ces apolipoprotéines est essentielle pour le métabolisme des chylomicrons. En effet, l'ApoC-II va se lier à la lipoprotéine lipase (LPL) ce qui va entraîner l'hydrolyse des triglycérides en acides gras non estérifiés. Les protéines FATP et CD36 vont ensuite faciliter l'absorption des acides gras par les cellules périphériques (cellules musculaires et adipocytes) pour la production ou le stockage d'énergie.

Lorsque les triglycérides contenus dans le chylomicron sont métabolisés, celui-ci diminue en taille et en volume, conduisant à la formation de chylomicrons résiduels enrichis en ester de cholestérol et en ApoE (Ginsberg, 1998; Feingold, 2000). Les phospholipides ainsi que les apolipoprotéines ApoA et C à la surface des chylomicrons sont transférés principalement vers les HDL qui leur transfère à leur tour l'ApoE. La clairance des chylomicrons résiduels au niveau hépatique est sous la dépendance du récepteur LRP ("LDL-Receptor Related Protein", protéine liée au récepteur des LDL) et du récepteur des LDL (LDLR) par la reconnaissance de l'Apo E (Jean Dallongeville, 2006).

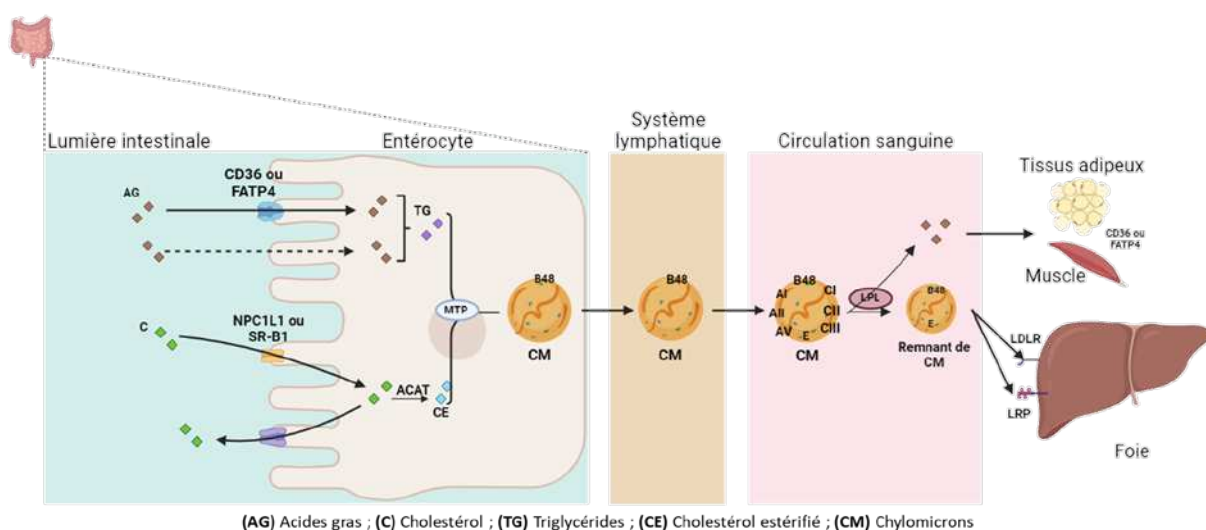


Figure 7 : La voie exogène (inspiré de Feingold, 2000).

2. La voie endogène

Dans la voie endogène, le métabolisme lipidique débute par la synthèse de lipoprotéines contenant de l'ApoB, principalement les VLDL (Figure 8). Les VLDL sont formées à partir des triacylglycérols et du cholestérol estérifié ou non, issus des chylomicrons résiduels. Les VLDL transportent les triglycérides du foie vers les tissus périphériques. Avant leur sécrétion, les VLDL sont assemblées au niveau du

réticulum endoplasmique par le transfert des triglycérides et des esters de cholestérol vers l'ApoB-100 (Feingold, 2000). Puis, leur maturation a lieu dans l'appareil de Golgi des hépatocytes. Comme dans l'intestin, la protéine de transfert MTP joue un rôle essentiel dans la lipidation et la sécrétion des VLDL dans la circulation. L'ApoC-II présente sur les VLDL va interagir et activer la LPL à la surface des cellules endothéliales qui sont directement exposées à la circulation sanguine (Dallinga-Thie et al., 2010). Les triglycérides contenus dans le noyau des VLDL naissantes seront alors métabolisés dans le muscle et le tissu adipeux, libérant des acides gras. La perte en triglycérides par les VLDL va alors donner naissance à des particules plus petites et plus denses et sont converties en particules résiduelles appelées IDL.

Les particules d'IDL acquièrent de l'ApoE provenant des VLDL et sont enrichies en esters de cholestérol et issus des HDL grâce à la protéine de transfert des esters de cholestérol CETP ("cholesteryl ester transfer protein", protéine de transfert des esters de cholestérol) alors que les triglycérides sont digérés sous forme d'acides gras suite à leur hydrolyse par la lipase hépatique. Ces lipoprotéines formées, moins riches en triglycérides mais plus riches en cholestérol, sont les LDL. Composées principalement d'ApoB-100 et d'esters de cholestérol, les LDL constituent le principal vecteur de cholestérol dans la circulation (Waldie et al., 2021).

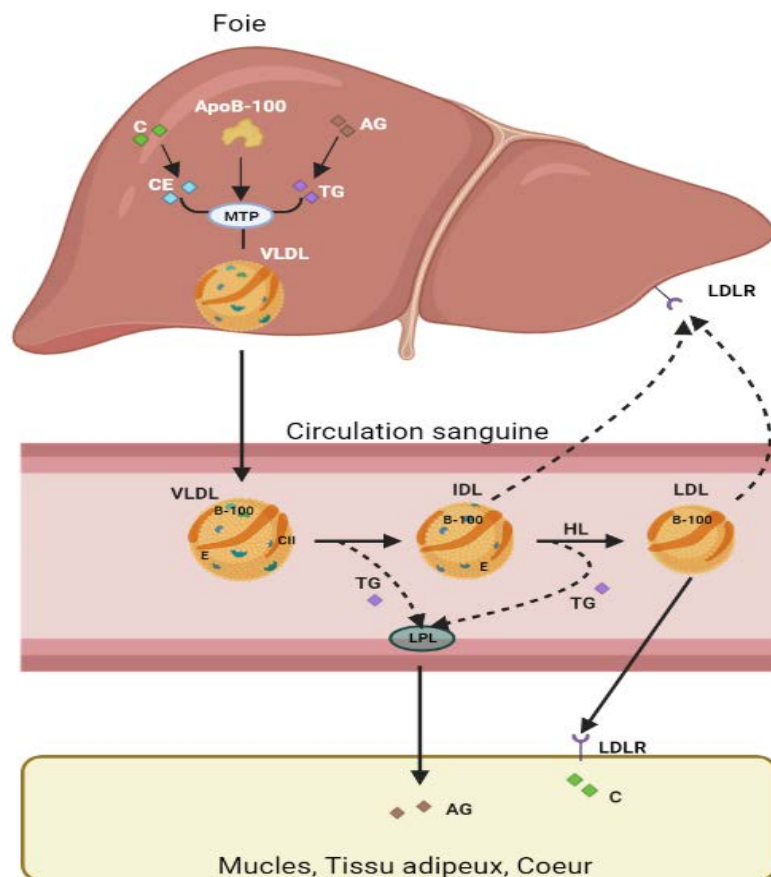


Figure 8 : La voie endogène (inspiré de Feingold, 2000).

3. Le transport inverse du cholestérol (RCT)

A l'inverse de la voie endogène, le RCT se fait depuis les tissus périphériques vers le foie et il est assuré par les HDL. Le RCT est la fonction principale des HDL et sera abordé plus en détail dans la partie B traitant des propriétés protectrices et du métabolisme des HDL.

Selon la nature des lipoprotéines, elles peuvent présenter des effets bénéfiques ou délétères dans la pathologie de l'athérosclérose.

III. Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité et de morbidité dans le monde industrialisé (Linton et al., 2019). L'athérosclérose est une pathologie vasculaire qui se caractérise par l'accumulation progressive de lipides et de cellules inflammatoires dans l'intima des artères, conduisant à la formation de plaques d'athérome. Il y a plus de 100 ans, Virchow a découvert que l'athérome contenait une substance grasse jaune. Cette substance a été identifiée plus tard comme du cholestérol par Windaus, ce qui a permis de montrer un rôle des lipides dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Mayerl et al., 2006).

Les désordres liés aux lipoprotéines plasmatiques sont des facteurs de risques importants des maladies cardiovasculaires (Sullivan & Lewis, 2011). De nombreuses études ont montré que des niveaux élevés en cholestérol LDL et en ApoB-100, protéine principale des LDL, sont directement associés au risque d'événements athérosclérotiques tandis que des niveaux élevés de HDL cholestérol (HDL-C) sont associés à une réduction du risque de maladie cardiovasculaire athérosclérotique (Linton et al., 2019).

L'athérosclérose est causée par la dysfonction des cellules endothéliales et elle est initiée par la rétention des lipoprotéines contenant de l'ApoB (LDL, VLDL, chylomicrons) dans l'espace sous endothélial ①. Les lipoprotéines retenues subissent des modifications oxydatives (oxydation et glycation non-enzymatique), ce qui va favoriser l'activation des cellules endothéliales. Une fois activées, celles-ci vont exprimer des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ("Vascular Cell Adhesion Molecule 1", molécule d'adhésion des cellules vasculaires 1), ICAM-1 ("Intercellular Adhesion Molecule 1", molécule d'adhésion intercellulaire 1) et des sélectines, des récepteurs pro-inflammatoires (Scavenger receptor-A ou SR-A), ainsi que des cytokines inflammatoires (interleukine IL-6, facteur de nécrose tumorale TNF α ("Tumor Necrosis Factor"), interféron IFN- γ). L'expression de ces différents facteurs va entraîner la fixation et la migration de monocytes ② ainsi que le recrutement des lymphocytes T ⑤ dans l'espace intimal de l'endothélium (Figure 9).

Dans cet espace, les monocytes se différencient en macrophages ③ qui peuvent internaliser les VLDL, des restes d'ApoE et les LDL modifiés via leurs récepteurs (SR-A, SR-B1, CD36 ou CD68) ④ pour se transformer ensuite en cellules spumeuses ⑥ (Fatkhullina et al., 2016; Linton et al., 2019). L'accumulation de cellules spumeuses et leur chargement progressif en LDL modifiées contribuent à la formation de stries lipidiques. Ainsi, l'environnement inflammatoire ainsi que la sécrétion de chimiokines par les macrophages va favoriser la migration vers l'intima de cellules musculaires lisses ⑦ qui vont participer à la formation d'une chape fibreuse autour du cœur lipidique ⑧. Cette étape constitue le début de la formation de la plaque d'athérome ⑨ (Figure 9). La signalisation inflammatoire induite par les cellules spumeuses permet de prolonger le recrutement des monocytes et des cellules immunitaires dans l'espace sous-endothélial. En raison de leur charge excessive en lipides, les cellules spumeuses ne peuvent pas quitter la plaque et finissent par mourir, soit par apoptose, soit par nécrose, conduisant à la formation du noyau nécrotique ⑩. Le noyau nécrotique déstabilise la structure compacte de la plaque, provoquant son détachement et entraînant par la suite la formation d'un thrombus dans la lumière du vaisseau. L'obstruction complète du vaisseau sanguin est à l'origine de certaines complications cardiovasculaires, telles que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral (AVC) (Fatkhullina et al., 2016; Waldie et al., 2021).

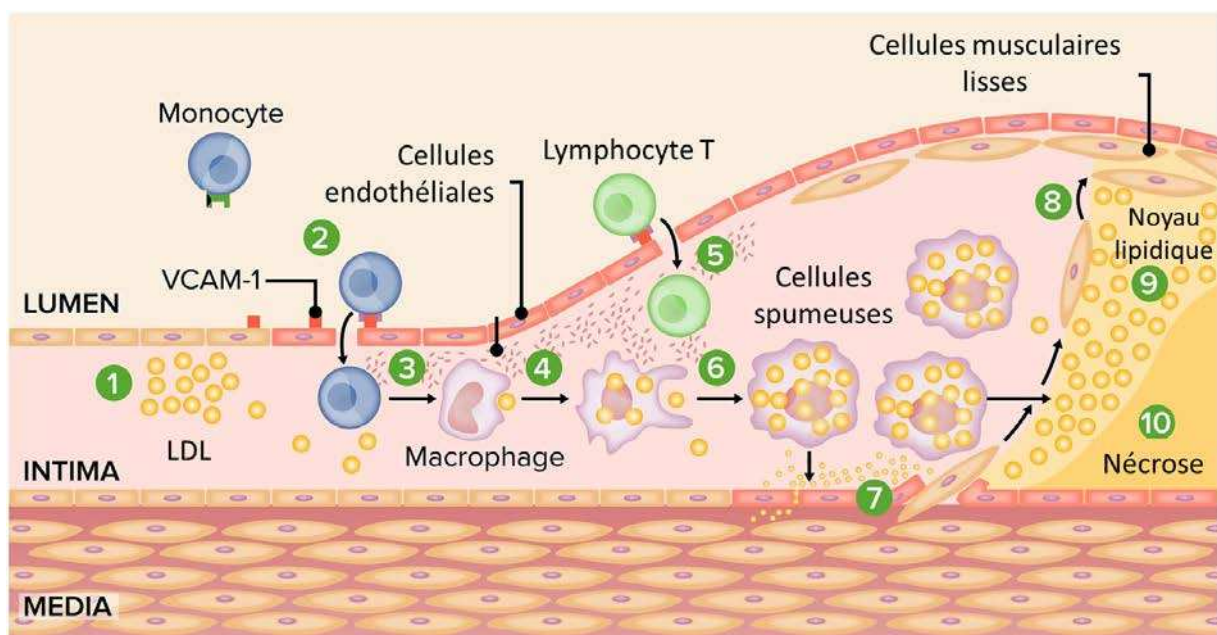


Figure 9 : Processus du développement de l'athérosclérose (adapté de [lecturio.com](https://www.lecturio.com)).

L'athérosclérose est responsable de plusieurs complications telles que les maladies coronariennes (donnant lieu à des infarctus du myocarde), les anévrismes de l'aorte abdominale, les artérites des membres inférieurs (donnant lieu à la claudication voire des amputations) et les AVC ischémiques. Les AVC ischémiques sont le plus souvent causés par l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot

sanguin (thrombus) due à la rupture d'une plaque d'athérome (Fatkhullina et al., 2016; Herrington et al., 2016; Taleb, 2016).

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont clairement établi la corrélation positive entre de faibles taux de HDL-C et l'augmentation du risque de la survenue de maladie cardiovasculaire. Cette association peut notamment s'expliquer par les propriétés antiathérogènes des HDL, ainsi que par leur implication dans le RCT depuis les tissus périphériques vers le foie (Assmann & Gotto, 2004).

B. Focus sur les lipoprotéines de haute densité (HDL)

I. Généralités sur les HDL

Les HDL sont principalement sécrétées dans le foie et l'intestin grêle. Le foie en est la principale source car il sécrète 70 à 80 % du HDL total présent dans le plasma (Zhou et al., 2015).

Les particules HDL sont des complexes pluri moléculaires, quasi-sphériques ou discoïdes. Elles sont composées principalement de lipides polaires solubilisés par des apolipoprotéines, mais également d'une petite quantité de lipides non polaires. Les HDL contiennent aussi de nombreuses autres protéines, notamment des enzymes et des protéines exprimées lors de la phase aiguë de l'inflammation. De plus, ces protéines ont des isoformes multiples et subissent facilement des modifications post-traductionnelles. Du fait de cette diversité protéique, les particules de HDL sont très hétérogènes dans leurs propriétés structurales, chimiques et biologiques (Kontush et al., 2015). Il apparaît donc important de détailler la composition, la structure et l'hétérogénéité des HDL du plasma humain.

1. Découverte des HDL

Les HDL sont depuis longtemps considérées comme étant le « bon cholestérol », ayant des effets bénéfiques pour l'ensemble de l'organisme, et en particulier, pour la santé cardiovasculaire (Jomard & Osto, 2020). La présence de lipoprotéines hydrosolubles a été découverte pour la première fois par Michael Macheboeuf en 1929 lorsqu'il a isolé une classe de protéines appelées alpha globulines, maintenant reconnues comme étant des HDL (Figure 10). En 1949, l'équipe de Gofman a proposé une nouvelle méthode de séparation des lipoprotéines du sérum. Ils ont isolé les HDL par ultracentrifugation et ils ont montré qu'une carence en HDL dans le plasma pouvait être considérée comme un facteur de risque de l'athérosclérose (Gofman et al., 1954). Au milieu des années 1970, l'hypothèse selon laquelle de faibles concentrations plasmatiques de HDL peuvent accélérer le développement de l'athérosclérose et des cardiopathies ischémiques en entravant l'élimination du cholestérol de la paroi artérielle a été formulée (G. J. Miller & Miller, 1975). Le terme « bon cholestérol » est souvent utilisé pour faire référence au cholestérol contenu dans les HDL et remonte à l'étude de Framingham (Castelli et al., 1986; D. Liu, 2020). Les études de Framingham en 1980 (T. Gordon et al., 1977; Castelli et al., 1992), Tromso en 1974 (N. E. Miller et al., 1977) et PROCAM en 1979 (Assmann & Schulte, 1988; Assmann et al., 1996) corroborent les hypothèses antérieures et montrent notamment une forte association positive entre les maladies coronariennes et de faibles taux de HDL-C.

A partir de ces études, de nombreuses approches ont été mises au point afin d'augmenter les taux des HDL-C, et assurer une cardioprotection (Jomard & Osto, 2020). Cependant, les études mises en place n'ont pas permis de démontrer un effet protecteur d'un taux élevé de HDL-C contre les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques, ce qui a incité la recherche à se concentrer sur les propriétés fonctionnelles plutôt que sur la quantité de HDL-C (C.-K. Lee et al., 2021).

Depuis les années 1970, les nombreuses recherches effectuées sur les HDL ont permis de mieux comprendre leur biologie, de la formation des particules, leur métabolisme, leur rôle dans le remodelage intravasculaire, le catabolisme médié ou non par des récepteurs, jusqu'à la structure et les compositions lipidiques et protéiques des particules, ainsi que leurs multiples fonctions biologiques (Kingwell et al., 2014).

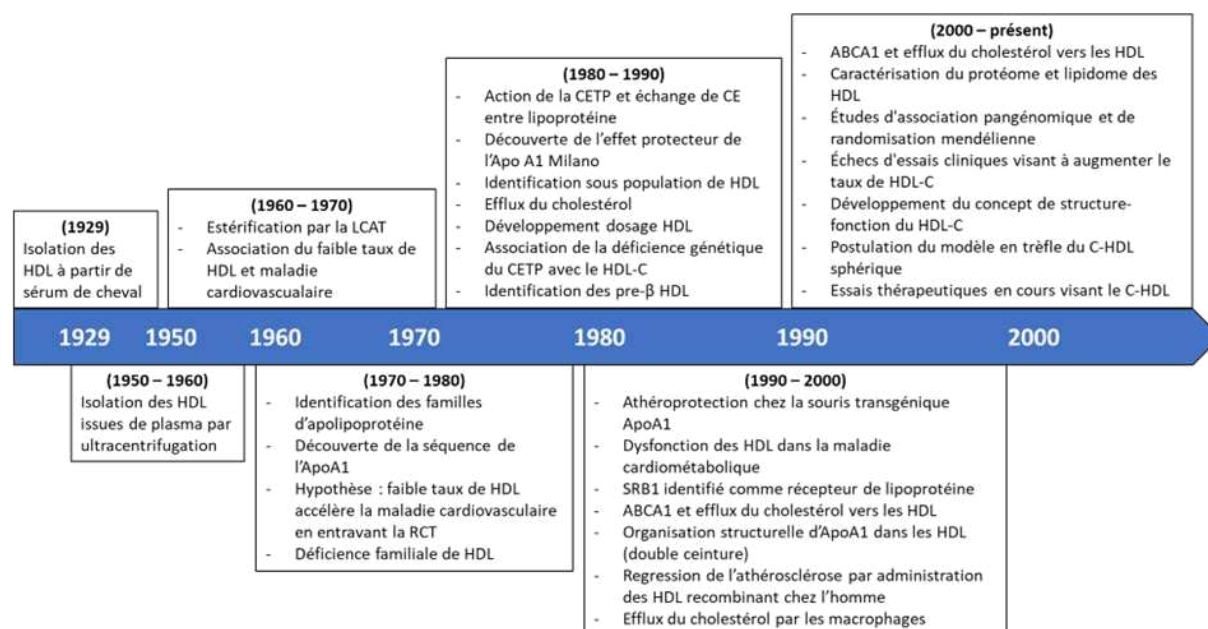


Figure 10 : Evolution de la recherche sur la biologie des HDL (traduite de Kingwell et al., 2014).

2. Structure et classification des HDL

Les HDL sont des lipoprotéines de petite taille, denses et riches en protéines par rapport aux autres classes de lipoprotéines (Zhou et al., 2015). Elles ont une taille moyenne allant de 5 à 17 nm et une densité de 1,063 à 1,210 g/mL (Kontush & Chapman, 2011; C.-K. Lee et al., 2021).

Les particules de HDL, comme toutes les lipoprotéines, sont formées d'un noyau hydrophobe, principalement composé d'esters de cholestérol et de triglycérides, entouré d'une bicouche lipidique amphipatique constituée de phospholipides et de cholestérol avec des protéines amphipathiques enchâssées (Figure 11) (Karathanasis et al., 2017). Elles contiennent des quantités à peu près égales

de protéines et de lipides (D. J. Gordon & Rifkind, 2010). Les constituants protéiques et phospholipidiques représentent respectivement environ 55 % et 25 % de la masse de ces particules. Le cholestérol sous forme estérifiée et libre (15 %) et les triglycérides (5 %) constituent le reste de la composition des HDL (Phillips, 2013; Kontush et al., 2013).

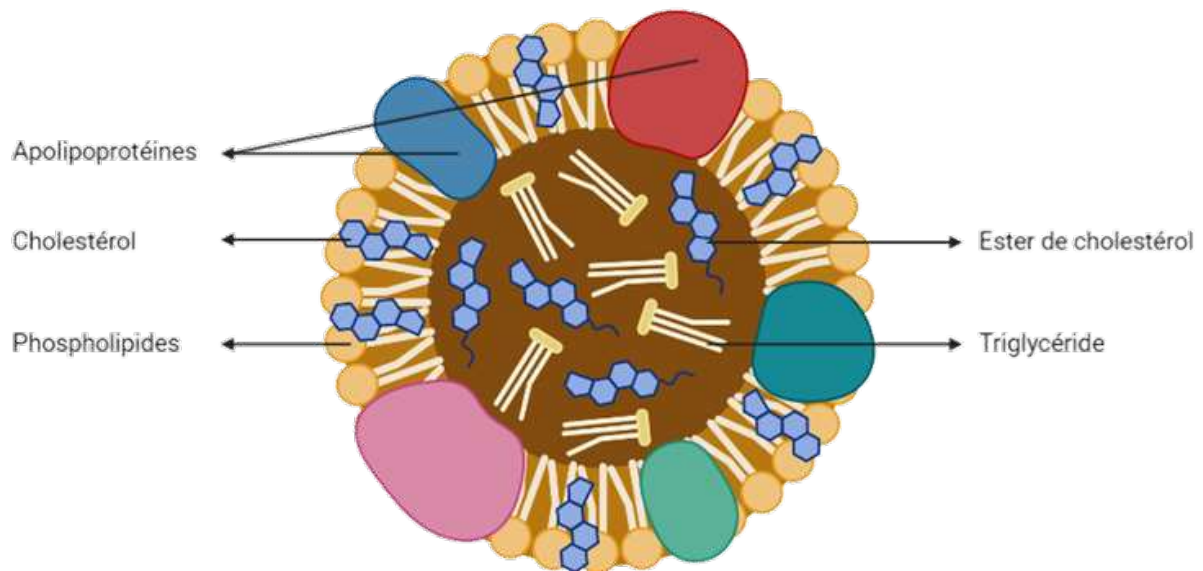


Figure 11 : Schéma de la structure d'une HDL mature.

Les HDL sont une classe de lipoprotéines complexes et hétérogènes dans la mesure où elles subissent des modifications au cours de leur maturation (Y. Zhang et al., 2019). L'importante hétérogénéité des particules de HDL est liée à la structure hautement dynamique de l'ApoA-I, composante protéique majeure des HDL (Kontush & Chapman, 2011). En conséquence, les particules de HDL sont classées selon différentes sous-populations en fonction de leur forme, de leur taille, de leur densité, de leur composition en protéines et de leur mobilité électrophorétique (Figure 12) (Camont et al., 2011).

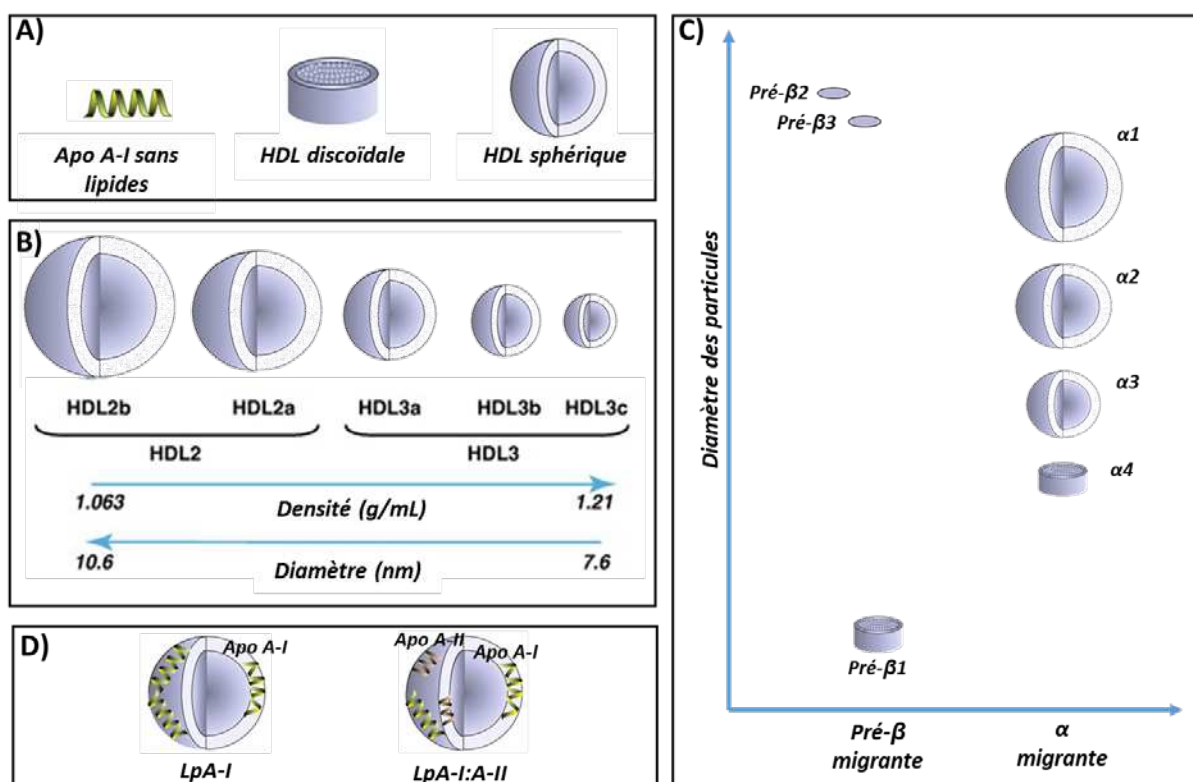


Figure 12 : Classification des différentes sous-classes de HDL en fonction de leur forme, leur densité et leur taille, leur mobilité électrophorétique, et leur composition en apolipoprotéine (adaptée de Camont et al., 2011 et Rye et al., 2009).

Les différences les plus évidentes entre les sous classes de HDL résident dans leurs propriétés physiques, telles que la taille et la structure. L'organisation structurale des particules de HDL varie selon leur composition. En considérant la structure des particules, il existe trois formes majeures de HDL : l'ApoA-I sans lipides, les particules de HDL sous forme discoïdale ou les particules sous forme sphérique (Figure 12 A) (Kontush et al., 2015).

L'ApoA-I sans lipides est présente à très faible concentration dans le plasma, et n'est jamais vraiment sous forme libre car cette apolipoprotéine présente une forte affinité pour les lipides et forme rapidement des particules discoïdales. Celles-ci sont relativement instables et de petite taille (< 8 nm) avec une faible teneur en lipides associés à l'ApoA-I (< 30 %). Les particules de HDL discoïdales sont composées de deux ou plusieurs molécules d'apolipoprotéines associées avec des phospholipides et du cholestérol non estérifié. Ces particules sont de bons substrats pour la Lécithine-Cholestérol Acyl Transférase (LCAT), l'enzyme qui permet l'estérification du cholestérol dans le plasma. Du fait de leur forte hydrophobicité, les esters de cholestérol vont se concentrer au centre des particules et transformer les particules discoïdales en grosses particules sphériques (Rye et al., 2009). Contrairement aux HDL discoïdales, les HDL sphériques sont plus larges (> 8 nm de diamètre) et possèdent un cœur hydrophobe constitué d'ester de cholestérol et de triglycérides. Les particules de

HDL discoïdales sont majoritaires dans le plasma mais ont une courte durée de vie, ce qui rend difficile leur isolation à partir de plasma. Cependant, une petite quantité peut être également détectée dans des compartiments extravasculaires tels que la lymphe périphérique (Kontush & Chapman, 2011).

Des différences dans la distribution des sous-classes de HDL ont été décrites pour la première fois par Gofman et al. au début des années 1950 en utilisant l'ultracentrifugation analytique (Gofman et al., 1954). En prenant en compte la différence de densité des particules de HDL, deux sous-fractions ont été identifiées : les HDL2 et HDL3. Les HDL2 sont les plus grandes, les moins denses (1,063-1,125 g/mL) et relativement riches en lipides. Les HDL3 sont quant à elles plus petites, plus denses (1,125-1,210 g/mL), et relativement riches en protéines (Figure 12 B) (Rye et al., 2009). La sous-fraction HDL3 est la plus représentée tandis que les plus grandes particules, appelées HDL1, sont très faiblement présentes chez la plupart des individus et ne sont pas détectables en concentration substantielle dans le plasma humain (Figure 13) (Rosenson et al., 2011). Les deux principales sous-fractions de HDL peuvent être séparées par d'autres méthodes d'ultracentrifugation, comme l'ultracentrifugation à vitesse zonale (Franceschini et al., 1985) ou l'ultracentrifugation à spin vertical unique (Kulkarni et al., 1997).

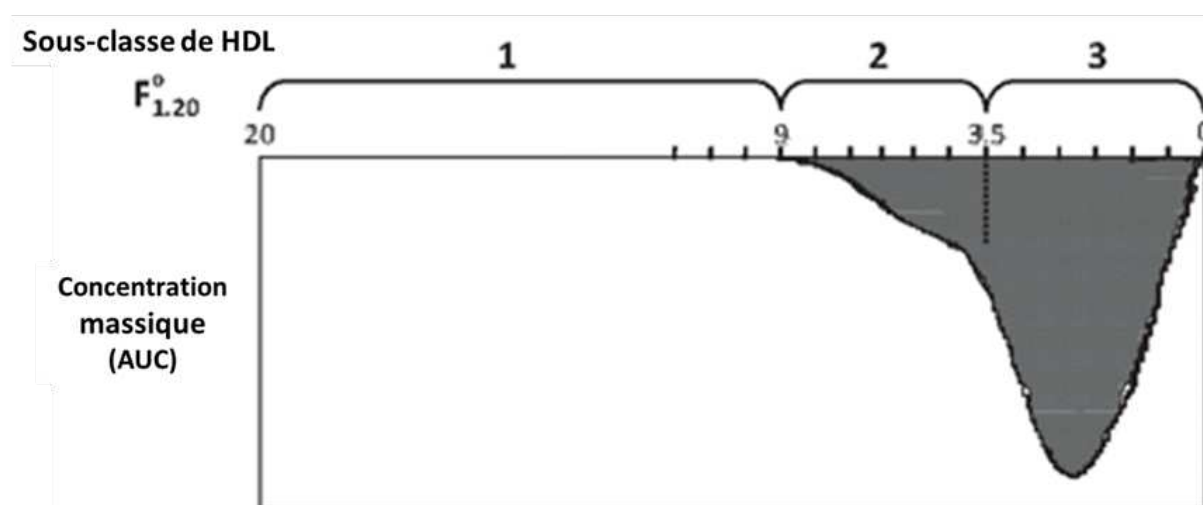


Figure 13 : Caractérisation des HDL par ultracentrifugation analytique. Les principales sous-classes de particules HDL sont distinguées par le taux de flottaison dans une solution saline de densité 1,2 g/mL ($F_{1.20}$) et par la masse totale, représentée par l'aire sous la courbe (AUC) (traduite de Rosenson et al., 2011).

En utilisant la méthode d'électrophorèse sur gel avec un gradient de polyacrylamide non-dénaturant (Nichols et al., 1986), les HDL2 et HDL3 peuvent être séparées en cinq sous-classes distinctes selon leurs mobilités électrophorétiques. Deux sous-classes de HDL2 et trois sous-classes de HDL3 ont été identifiées : HDL2a (8,8-9,7 nm), HDL2b (9,7-12,9 nm), HDL3a (8,2-8,8 nm), HDL3b (7,8-8,2 nm) et HDL3c (7,2-7,8 nm) (Figure 12 B) (Zhou et al., 2015).

Une autre méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation analytique de plusieurs sous-espèces de HDL en fonction de leur charge et de leur taille. Les particules α -migrantes représentent la majorité des HDL circulantes, et les particules pré- β migrantes sont des HDL discoïdales naissantes à faible teneur en lipides. Cette méthode de séparation présente un pouvoir de résolution élevé et permet d'identifier cinq sous-classes distinctes de HDL appelées pré β (pré β -1 = 5,6 nm et pré β -2 = 12,0-14,0 nm), et α (α -1 = 11,0 nm, α -2 = 9,2 nm, α -3 = 8,0 nm et α -4 = 7,4 nm) (Kontush et al., 2015; Zhou et al., 2015). Les HDL pré β -1 et les α -4 sont de petites particules sous forme de disque et les HDL α -3 et α -2 sont des particules sphériques de moyenne et grande taille. La particule α -1 HDL, quant à elle, est une particule sphérique de très grande taille (Figure 12 C). Les patients ayant des maladies coronariennes présentent souvent des diminutions significatives des grandes HDL α -1 et α -2, et des augmentations légères des petites HDL discoïdales pré β -1 et α -4 (Schaefer et al., 2010).

Les deux apolipoprotéines principales retrouvées dans les HDL sont l'ApoA-I et l'ApoA-II. Cette composition a également permis de classer les HDL en deux sous populations : les LpA-I et les LpA-I:A-II. Les LpA-I contiennent uniquement de l'ApoA-I et les LpA-I:A-II contiennent de l'ApoA-I et de l'ApoA-II (Figure 12 D). Dans le plasma humain, l'ApoA-I est répartie de manière égale entre les HDL LpA-I et LpA-I:A-II, tandis que la quasi-totalité de l'ApoA-II est retrouvée dans les LpA-I:A-II. Les LpA-I:A-II se trouvent principalement dans la gamme de densité HDL3, alors que les LpA-I sont des composants importants des HDL2 et HDL3 (Cheung & Albers, 1982; Rye et al., 2009; Kontush & Chapman, 2011).

3. Composition des HDL

Les particules de HDL sont très différentes en termes de composition, de taille et de structure, et celles-ci présentent de nombreuses propriétés fonctionnelles. Ces propriétés sont déterminées par les différents composants protéiques et lipidiques constitutifs des HDL mais également par d'autres molécules qu'elles transportent comme les micro-ARN, les hormones, les caroténoïdes, les vitamines (Vickers & Remaley, 2014). Des recherches récentes, ainsi que les preuves disponibles sur la propriété des HDL affirment que la qualité des HDL est plus importante que la quantité pour leurs fonctions protectrices (Rader & Tall, 2012).

a. Composition protéique des HDL

Contrairement aux autres lipoprotéines, les HDL transportent une multitude de protéines qui fournissent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles uniques (Thakkar et al., 2021).

Il existe différentes techniques d'isolement des HDL pour étudier leurs compositions protéiques. Cependant, les techniques utilisées peuvent avoir un impact considérable sur les résultats de l'analyse

protéomique des HDL. La plupart des études protéomiques des HDL basées sur la spectrométrie de masse utilisent l'ultracentrifugation à densité saline pour isoler les HDL. La limite de cette méthode est liée à la concentration en sels utilisés. La présence de sel peut en effet perturber les interactions protéines-protéines ou protéines-lipides et donc diminuer le nombre de protéines détectables. D'autres études utilisent la méthode d'isolement par chromatographie d'affinité en utilisant un anticorps anti ApoA-I. Cette méthode présente également des limites dans la mesure où les anticorps peuvent être spécifiques de certaines conformations de l'ApoA-I, qui est une protéine à forte dynamique conformationnelle. De plus, ces anticorps peuvent avoir de l'affinité pour certains contaminants, rendant plus faible son affinité pour les particules composées de l'ApoA-I. Toutes les méthodes permettant d'isoler les HDL présentent donc des avantages et des limites. C'est pourquoi il est important de ne pas se baser sur une seule mais de comparer différentes méthodes d'isolement (Shao & Heinecke, 2018; Davidson et al., 2022).

Les groupes de Davidson et Shah maintiennent ainsi un site Web qui fait l'inventaire des protéines identifiées dans les HDL mais aussi dans les LDL et recensées dans plusieurs études. Sur l'ensemble de ces études, 936 protéines ont été identifiées dans les HDL. Il est important de noter que les protéines recensées sur le site ont été détectées dans au moins trois études indépendantes issues de trois laboratoires indépendants (*HDL Proteome Watch Page*). A partir de cette technique de recensement, 251 protéines ont été reportées (Davidson et al., 2022).

Ces protéines sont classées en différents sous-groupes correspondant aux apolipoprotéines, aux enzymes, aux protéines de transfert lipidique, aux inhibiteurs de protéinase, aux protéines de réponse à la phase aiguë, aux composants du complément et à d'autres protéines (Tableau 3) (Vaisar et al., 2007; Kontush et al., 2015). Tous ces composants contribuent aux propriétés anti-inflammatoires et antiathérogènes des HDL (Shao et al., 2021). Les apolipoprotéines ainsi que les enzymes ont été longtemps considérées comme les seuls constituants protéiques des HDL mais elles sont désormais reconnues comme des composants clés (Kontush & Chapman, 2011).

Tableau 3 : Composants protéiques majeurs des HDL (traduit de Kontush et al., 2015).

Protéines	Masse kDa	Fonction majeure
<u>Apolipoprotéines</u>		
ApoA-I	28	Structurelle et fonctionnelle, activation LCAT
ApoA-II	17	Structurelle et fonctionnelle
ApoA-IV	46	Structurelle et fonctionnelle
ApoA-V	39	Activation de LPL, inhibition de la sécrétion TG
ApoC-I	6,6	Modulatrice de l'activité CETP
ApoC-II	8,8	Activation de LPL
ApoC-III	8,8	Inhibition de LPL
ApoC-IV	11	Régulation du métabolisme des TG
ApoD	19	Liaison avec petites molécules hydrophobes
ApoE	34	Structurelle et fonctionnelle, ligand LDL-R et LRP
ApoF	29	Inhibition de CETP
ApoH	38	Liaison aux molécules chargées négativement
ApoJ	70	Liaison aux molécules hydrophobes, interaction avec récepteurs cellulaires
ApoL-I	44/46	Facteur trypanolytique du sérum humain
ApoM	25	Liaison avec petites molécules hydrophobes
<u>Enzymes</u>		
LCAT	63	Esterification du cholestérol
PON1	43	Lactonase dépendant du calcium
PAF-AH (LpPLA2)	53	Hydrolyse des phospholipides oxydés à chaîne courte
GSPx-3	22	Réduction des hydroperoxydes par glutathion
<u>Protéines de transfert lipidique</u>		
PLTP	78	Conversion des HDL en particules plus grandes et plus petites, transport du LPS
CETP	74	Echange des CE et TG entre HDL et les lipoprotéines contenant l'ApoB
<u>Protéines de la phase aiguë</u>		
SAA1	12	Réactif majeur de la phase aiguë
SAA4	15	Réactif mineur de la phase aiguë
Alpha-2-HS-glycoprotein	39	Réactif négatif en phase aiguë
Chaîne alpha du fibrinogène	95	Précurseur de la fibrine, cofacteur dans l'agrégation des plaquettes
<u>Composants du complément</u>		
C3	187	Activation du complément
<u>Inhibiteurs de protéase</u>		
Alpha-1-antitrypsine	52	Inhibition de la sérine protéase
HRP	39	Substrat leurre pour empêcher la protéolyse

Protéines majeures des HDL, les apolipoprotéines régulent le transport ainsi que le métabolisme du cholestérol. Chez l'homme, les HDL contiennent 14 types différents d'apolipoprotéines telles que l'ApoA-I, l'ApoA-II, l'ApoA-IV, l'ApoC-I, l'ApoC-II, l'ApoC-III, l'ApoC-IV, l'ApoD, l'ApoE, l'ApoF, l'ApoH, l'ApoJ, l'ApoL-I et l'ApoM (Bhale & Venkataraman, 2022).

L'ApoA-I est le constituant protéique principal représentant environ 70 % de la masse protéique des HDL, et l'ApoA-II représente 15 à 20 %. Les 10 à 15 % restants correspondent aux protéines amphipathiques mineures comme les ApoC, ApoE, ApoD, ApoM et ApoA-IV, avec des enzymes et des protéines de transfert des lipides telles que la lécithine : LCAT et CETP (Davidson et al., 2009).

Dans cette partie ne seront présentées que les apolipoprotéines majeures telles que l'ApoA-I, l'ApoA-II, les ApoC, l'ApoE, l'ApoD et l'ApoM (Kontush & Chapman, 2011), tout en allant plus en détail pour l'ApoA-I, ainsi que pour certaines protéines qui apparaissent importantes pour la compréhension de cette thèse.

❖ Les apolipoprotéines

- ApoA-I

L'**apolipoprotéine A-I** est une protéine importante dans les différentes fonctions et le métabolisme des HDL. Tous les aspects structuraux et fonctionnels relatifs à cette protéine seront abordés par la suite dans la partie B-II.

- ApoA-II

L'**apolipoprotéine A-II** est la seconde protéine majoritaire des HDL, d'une masse moléculaire de 17 kDa. Le gène codant pour l'ApoA-II est situé sur le chromosome 1, au niveau du locus 1p21 à 1qter (Li et al., 1988). Synthétisée principalement dans le foie mais également dans l'intestin, l'ApoA-II est présente dans environ 50 % des HDL et le ratio moléculaire moyen ApoA-I:ApoA-II dans le plasma humain est de 2:1. L'ApoA-II circule sous forme d'homodimère de deux chaînes polypeptidiques identiques reliées par un seul pont disulfure en position 6. La forme monomérique de l'ApoA-II est composée de 77 résidus avec trois hélices amphipathiques (Silva et al., 2007). Cette protéine joue un rôle structurel et fonctionnel dans les HDL. En effet, elle confère aux HDL une courbure de la surface lipidique lors de la conversion des particules discoïdales en particules sphériques. Elle joue par ailleurs un rôle important dans le métabolisme lipidique (Castellani & Lusis, 2001; Gao et al., 2012; Florea et al., 2022).

- ApoC

La famille des **apolipoprotéines C** est un groupe de petites apolipoprotéines échangeables produites principalement par le foie mais aussi par l'intestin. Cette famille regroupe quatre petites protéines : l'ApoC-I, l'ApoC-II, l'ApoC-III et l'ApoC-IV qui sont des composants de surface des chylomicrons, des VLDL mais aussi des HDL, notamment en période de jeûne. Les gènes codants pour l'ApoC-I, l'ApoC-II

et l'ApoC-IV sont proches sur le chromosome 19 et forment un cluster avec le gène de l'ApoE (R. Mahley et al., 1985; Kontush & Chapman, 2011).

L'**ApoC-I** est la plus petite apolipoprotéine du groupe des ApoC (6,6 kDa) composée de 57 acides aminés. Les résidus 7 à 14, 18 à 29 et 33 à 53 sont des régions à structure hélicoïdale et de liaison aux lipides. Cette protéine est impliquée dans l'activation de la LCAT et participe au remodelage des HDL. Elle est également impliquée dans l'inhibition de la lipase hépatique et de la CETP. Elle est à l'origine de la majeure partie de l'activité inhibitrice de la CETP trouvée dans les HDL circulantes (R. Mahley et al., 1985).

L'**ApoC-II**, une protéine de 8,8 kDa composée de 79 acides aminés, est retrouvée dans les VLDL et les HDL et peut s'échanger entre leur surface. L'ApoC-II est un cofacteur de la LPL qui stimule l'hydrolyse des triglycérides. En effet, des mutations de perte de fonction de l'ApoC-II entraînent une hypertriglycéridémie marquée due à une incapacité à métaboliser les lipoprotéines riches en triglycérides (Wolska et al., 2017).

L'**ApoC-III** est une protéine de 79 résidus et de masse moléculaire égale à 8,8 kDa. Le gène codant pour cette protéine se situe sur le chromosome 11 à moins de trois kilobases de celui de l'ApoA-I. C'est la protéine la plus abondante du groupe des ApoC qui est retrouvée majoritairement dans les VLDL et en petite quantité dans les HDL. L'ApoC-III est un inhibiteur de la LPL ainsi que de la lipase hépatique. L'ApoC-III inhibe l'interaction des lipoprotéines riches en triglycérides avec leurs récepteurs. Des études ont montré que les mutations de perte de fonction de l'ApoC-III entraînent une diminution des taux de triglycérides sériques conjuguée à une réduction du risque de maladie cardiovasculaire (Taskinen & Borén, 2016; Ramms & Gordts, 2018).

L'**ApoC-IV** est une protéine de 11 kDa découverte en 1996 (L.-H. Zhang et al., 1996). Une homologie avec les séquences de l'ApoC-I et l'ApoC-II indique qu'elle pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des lipides (Allan & Taylor, 1996), mais sa fonction reste très peu connue. Allan et al ont montré que la surexpression de l'ApoC-IV chez la souris induit une hypertriglycéridémie. Dans le plasma, 80 % de cette protéine est retrouvée dans les VLDL et une grande partie restante dans les HDL. La teneur en ApoC-IV dans les HDL est inférieure à celle des autres protéines ApoC (Kontush & Chapman, 2011).

- ApoE

L'**apolipoprotéine E** est une glycoprotéine circulante de 34,2 kDa composée de 299 acides aminés. Comme l'ApoA-I, elle est un composant clé dans la structure et la fonction des HDL bien qu'elle y soit faiblement présente. L'ApoE est codée par le gène *APOE* situé sur le chromosome 19. Elle est

principalement synthétisée par les hépatocytes (environ 75 %), mais également par les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie et les neurones du système nerveux central. Dans le cerveau, l'ApoE est synthétisée *in situ* et ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique depuis la circulation périphérique. D'autres cellules de l'organisme, telles que les macrophages, sont également capables de synthétiser l'ApoE (R. W. Mahley, 2016). Cette apolipoprotéine est sécrétée sous une forme pauvre en lipides, mais en raison de son avidité pour ceux-ci, elle existe toujours en association avec les lipides dans la lymphe, le plasma et dans le liquide céphalo-rachidien. L'ApoE se trouve sur des particules de lipoprotéines et elle a également une affinité pour les phospholipides avec lesquels elle peut former des disques (Y. Huang & Mahley, 2014).

L'ApoE est une protéine tétramérique formée de huit hélices- α amphipathiques. Elle possède deux domaines structuraux séparés par une région charnière. Le domaine N-terminal forme un faisceau de quatre hélices- α antiparallèles et contient la région de liaison au récepteur au LDL. Le domaine C-terminal contient la région de liaison aux lipides, également formée d'hélices- α amphipathiques (R. W. Mahley et al., 2009; R. W. Mahley, 2016).

L'ApoE fait partie des apolipoprotéines échangeables entre lipoprotéines et elle est associée aux chylomicrons, aux restes de chylomicrons, aux VLDL, aux IDL et aux HDL. La majeure partie de l'ApoE circulante est transportée par les lipoprotéines contenant des triglycérides. Elle joue un rôle clé dans la clairance de ces lipoprotéines en servant de ligand pour la liaison à des récepteurs spécifiques de surface cellulaire (Y. Huang & Mahley, 2014).

Il existe trois isoformes de l'ApoE : ApoE2, ApoE3 et ApoE4, qui diffèrent au niveau des acides aminés 130 et 276. L'ApoE2 possède deux résidus cystéine aux positions 130 et 276, tandis que l'ApoE4 possède deux arginines aux mêmes positions. L'ApoE3, quant à elle, est composée d'une cystéine en position 130 et d'une arginine en position 176. Parmi les isoformes, l'ApoE3 est considérée comme la forme normale et se lie préférentiellement au HDL, tandis que l'ApoE4 se lie au VLDL (Kontush & Chapman, 2011; Y. Huang & Mahley, 2014; R. W. Mahley, 2016). L'ApoE2 est défectueuse dans la liaison aux récepteurs des lipoprotéines et elle est associée à la maladie génétique de l'hyperlipoprotéïnémie de type III (R. W. Mahley, 1988). L'ApoE4 est associée à un risque accru de maladie d'Alzheimer et d'athérosclérose (R. W. Mahley et al., 2009; R. W. Mahley, 2016).

- ApoD

L'**apolipoprotéine D** est une glycoprotéine de 169 acides aminés. Elle fait partie de la famille des lipocalines dont la fonction est la liaison et le transport de petite molécules hydrophobes, notamment l'acide arachidonique (Dassati et al., 2014). Le gène codant pour l'ApoD est localisé sur le chromosome

3 avec un poids moléculaire pour la protéine variant de 19 à 32 kDa selon son degré de glycosylation (Annema et al., 2022). Cette protéine présente très peu de similitudes structurales avec les autres apolipoprotéines. Elle possède une poche hydrophobe située au cœur d'une structure en tonneau- β pour le transport des molécules hydrophobes (S. M. Gordon, 2014). L'ApoD diffère également des autres apolipoprotéines par son expression tissulaire. Faiblement exprimée par le foie et l'intestin, elle est principalement produite par le cerveau, les glandes surrénales et les reins. La majorité de l'ApoD circulante est liée aux particules HDL, mais une petite fraction est également transportée par les LDL et VLDL. Au sein des HDL, l'ApoD jouerait un rôle dans la stabilisation de la LCAT et dans l'augmentation de l'estérification du cholestérol. Une association de cet apolipoprotéine avec divers troubles neurologiques a été décrite, notamment dans la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et dans les AVC (Muffat & Walker, 2010; S. M. Gordon, 2014).

- ApoM

Majoritairement retrouvée dans les HDL, l'**apolipoprotéine M** est également présente dans les chylomicrons, les VLDL et les LDL. L'ApoM est une protéine de 188 acides aminés ayant un poids moléculaire de 26 kDa (Dahlbäck et al., 2008). Le gène de l'ApoM humaine est situé en p 21.31 sur le chromosome 6. L'ApoM est apparentée à la famille des lipocalines et elle partage 19 % d'identité avec l'ApoD (Rassart et al., 2000). Elle conserve un peptide signal hydrophobe dans sa forme mature, qui sert à ancrer la protéine à la surface des lipoprotéines et permet d'empêcher son élimination par filtration dans le rein (Dahlbäck et al., 2008).

Cette protéine est exprimée dans le foie, les reins et faiblement dans les tissus adipeux. L'ApoM est un transporteur important de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un petit lipide bioactif ayant des effets sur l'angiogenèse, le trafic lymphocytaire, la migration des cellules endothéliales et l'inflammation. Comme l'ApoD, l'ApoM possède une poche de liaison hydrophobe située au cœur d'une structure en tonneau- β qui lui permet de se lier à la S1P (Luo et al., 2004; Christoffersen, 2021).

- Autres apolipoprotéines

D'autres apolipoprotéines ayant des fonctions intéressantes sont présentes dans les HDL mais à faible concentration. L'ApoA-IV présente des fonctions antioxydantes *in vitro* tandis que l'ApoJ contribue à la protection des cellules endothéliales contre l'apoptose (Darabi et al., 2016). De nombreuses autres fonctions sont associées aux apolipoprotéines contenues dans les HDL, mais ne seront pas abordées en détail dans le cadre de ce mémoire.

❖ Les enzymes

En plus des apolipoprotéines, les particules de HDL circulantes transportent certaines enzymes qui sont impliquées dans de nombreux mécanismes tels que l'efflux du cholestérol ou les propriétés antioxydantes.

La **Lécithine-Cholestérol Acyl Transférase (LCAT)**, une enzyme principalement produite dans le foie, est associée aux particules de HDL, et en petite quantité aux LDL (Semenkovich et al., 2016). Elle est composée de 416 acides aminés avec un poids moléculaire de 47 kDa et de 58 kDa après glycosylation (Kosman & Jonas, 2001). Elle joue un rôle clé dans le RCT et contribue également à la protection des LDL contre l'oxydation (Darabi et al., 2016). Son rôle principal au sein des HDL et des lipoprotéines contenant l'ApoB est l'estérification du cholestérol. La LCAT est une enzyme activée par les apolipoprotéines, notamment l'ApoA-I. Dans le plasma, 75 % de l'activité de la LCAT est associée au HDL, et l'ApoA-I est le principal activateur catalytique de la LCAT. Cette enzyme va d'abord hydrolyser les phospholipides en dodecylphosphocholine, puis transférer l'acide gras issu de l'hydrolyse au cholestérol pour donner un ester de cholestérol. Ce processus permet la transformation des HDL naissantes discoïdales en HDL sphériques contenant un noyau d'esters de cholestérol (Sorci-Thomas et al., 2009; Kontush & Chapman, 2011).

Parmi les enzymes associées au HDL, on retrouve également la **paraoxonase**, une protéine composée de 354 acides aminés avec une masse moléculaire de 43 kDa. Elle a été découverte dans le sérum humain au début des années 1950 (Aldridge, 1953). Son nom vient de sa capacité à hydrolyser un substrat organophosphoré appelé paraoxon. La famille génétique de la paraoxonase est composée de trois membres PON1, PON2 et PON3, situés les uns à côté des autres sur le bras long du chromosome 7. La PON1 est synthétisée au niveau du foie puis sécrétée dans le sang où elle s'associe de façon exclusive aux HDL par la présence de sa tête hydrophobe (Goswami et al., 2009). La paraoxonase exerce un effet anti-inflammatoire et protecteur contre les dommages oxydatifs sur les cellules et des lipoprotéines circulantes (Ferretti et al., 2005). PON1 est une lactonase qui, associée aux HDL, possède des propriétés antioxydantes et antiathérogènes. Elle prévient, d'une part, de l'oxydation des LDL induite par les macrophages et, d'autre part, augmente la liaison des HDL aux macrophages favorisant ainsi l'efflux de cholestérol (Efrat & Aviram, 2010). Grâce à sa capacité à hydrolyser de façon réversible les composés organophosphorés, PON1 est le moyen de protection principal dans le système nerveux contre la neurotoxicité de ces derniers. PON3 présente des propriétés similaires à PON1, avec également une association aux HDL (Kontush & Chapman, 2011).

❖ Les protéines de transfert de lipides

Les protéines de transfert lipidique associées aux HDL jouent un rôle important dans leur métabolisme. Une carence en protéines de transfert augmente le taux de HDL et diminue celui des LDL (Chowaniec & Skoczyńska, 2018). Les deux protéines de transfert lipidique associées aux HDL sont la protéine de transfert des phospholipides (**PLTP**) et la **CETP** dont l'abondance est 1000 fois inférieure à celle de l'ApoA-I. L'hétérogénéité des HDL est régulée par la PLTP, la CETP mais aussi par la LCAT (Singh et al., 2021).

La **PLTP** est une protéine glycosylée composée de 476 acides aminés avec une masse moléculaire de 78 kDa. Son gène est situé sur le chromosome 20 et la protéine est synthétisée par de nombreux tissus avec une concentration importante dans les poumons, le placenta et les ovaires. La PLTP joue un rôle important dans la distribution, la régulation du métabolisme des HDL et dans le RCT. En effet, la PLTP a pour fonction de catalyser le transfert des phospholipides, principalement la phosphatidylcholine, entre les différentes classes de lipoprotéines (Huuskonen et al., 2001; Chowaniec & Skoczyńska, 2018). Ainsi, elle régule la composition lipidique et contribue à l'augmentation de la taille des particules de HDL par ce transfert de phospholipides.

La **CETP** est une glycoprotéine hydrophobe de 53 kDa, composée de 476 acides aminés. Le gène de la CETP est situé sur le chromosome 16 et la protéine est synthétisée dans le foie, dans les reins et dans de nombreux autres tissus. Une expression significative de la CETP a également été détectée dans les macrophages. La CETP est une protéine majeure dans le métabolisme des lipides car elle régule la composition lipidique des HDL. En effet, sa fonction est de transporter les esters de cholestérol contenus dans les HDL vers les LDL, les IDL, les VLDL et les chylomicrons en échange de triglycérides (Ginsberg, 1998; Chowaniec & Skoczyńska, 2018). Lors du processus d'échange lipidique, le domaine N-ter de la CETP s'associe aux HDL tandis que le domaine C-ter s'associe aux autres lipoprotéines formant ainsi un complexe ternaire (L. Zhang et al., 2012). La CETP a été largement étudiée pour ses propriétés antiathérogènes dans de nombreuses études cliniques que nous détaillerons par la suite.

❖ Les protéines de la phase aiguë

Au cours de la réponse de phase aiguë de l'inflammation ou lors d'un traumatisme, les cytokines sécrétées induisent des modifications dans la composition des lipoprotéines plasmatiques. Les niveaux de HDL sont considérablement réduits et leur composition est altérée (Jahangiri, 2010).

L'**amyloïde sérique A (SAA)** est une protéine réactive majeure de la phase aiguë associée aux HDL plasmatiques et exprimée exclusivement dans le foie. Le gène exprimant la SAA se situe sur le

chromosome 11. La SAA appartient à une famille de protéines de faible poids moléculaire (104 à 112 résidus d'acides aminés) se composant de quatre isoformes : SAA1, SAA2, SAA3 et SAA4. Parmi ces isoformes, trois d'entre elles sont exprimées chez l'Homme : SAA1, SAA2, et SAA4 (Sato et al., 2016). Dans le sang, la plupart des SAA dérivées du foie sont associées aux HDL et peuvent devenir la principale apolipoprotéine en remplaçant l'ApoA-I (K.-H. Cho, 2022). La SAA est une apolipoprotéine échangeable entre les HDL et les LDL et VLDL grâce à l'activité de la CETP. Elle joue un rôle important dans certaines pathologies inflammatoires, notamment la septicémie, l'athérosclérose et la polyarthrite rhumatoïde (Targońska-Stępniaak & Majdan, 2014). Lors d'une infection aiguë, d'une inflammation persistante résultant notamment de lésions tissulaires dans le sang, la production de la SAA est stimulée par des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6 et TNF α . Par conséquent, sa concentration est augmentée jusqu'à 1000 fois atteignant jusqu'à 5 mg/mL (Jayaraman et al., 2015; Shridas et al., 2021; K.-H. Cho, 2022) alors qu'elle circule à faible concentration dans des conditions normales (< 8 μ g/mL). Lors d'une inflammation, elle contribue jusqu'à 80 % de la composition en apolipoprotéines dans les HDL, dépassant ainsi la quantité en ApoA-I. L'augmentation de la SAA dans les HDL va altérer leur fonction protectrice et augmenter l'oxydation des LDL (Targońska-Stępniaak & Majdan, 2014).

❖ Les inhibiteurs de protéases

Les protéases présentent de nombreuses fonctions biologiques, notamment la digestion des aliments, la dégradation lysosomale et les cascades de signalisation. Cependant l'hydrolyse d'une liaison peptidique par une protéase est une réaction irréversible qui nécessite un contrôle ciblé de son activité par des molécules inhibitrices de protéases. Les inhibiteurs de protéases naturels ont pour fonction de contrôler la protéolyse et d'inactiver les protéases concurrentes ou prédatrices (Fear et al., 2007).

Les études protéomiques montrent que les HDL sont fortement enrichies en protéases et en inhibiteurs de protéases (Davidson et al., 2022). L'équipe de Gordon et Remaley a déterminé que la majorité des protéases associées aux HDL sont des sérines protéases et que la majorité des inhibiteurs de protéases sont des inhibiteurs de sérines protéases, c'est-à-dire des serpins (de l'anglais *serpin* pour serine protease inhibitor) (S. M. Gordon & Remaley, 2017). Ne pouvant pas y aller d'elles même, les serpins utilisent les HDL comme vecteurs de transport pour atteindre les compartiments vasculaires (Davidson et al., 2022). Ce sont des régulateurs importants des voies biologiques impliquées dans l'inflammation, la coagulation, l'angiogenèse et la dégradation de la matrice (Kontush et al., 2015).

La neutrophile élastase (NE) est une protéase potentiellement modifiable par les HDL et qui est impliquée dans l'athérosclérose. Elle est abondamment produite par les neutrophiles et les macrophages dans les lésions athérosclérotiques (S. M. Gordon & Remaley, 2017). L'activité de la NE est associée à une instabilité de la plaque d'athérome et donc à un risque plus élevé de maladies cardiovasculaires. L'inhibition de cette protéase par l'AAT apparaît être une stratégie efficace dans certaines pathologies comme l'AVC ischémique ou encore l'emphysème pulmonaire (Moldthan et al., 2014; Moreno et al., 2014).

L'**alpha-1 antitrypsine (AAT)**, une glycoprotéine de la phase aiguë d'un poids moléculaire de 52 kDa, est une serpine synthétisée principalement par les hépatocytes puis sécrétée dans le plasma. Comme l'AAT ne peut pas traverser les cellules endothéliales vasculaires des grandes artères, elle s'associe aux HDL pour atteindre la lésion inflammatoire. Des études protéomiques ont identifié la présence de l'AAT dans les fractions de HDL2 et HDL3 (Vaisar et al., 2007; Moreno et al., 2014; Stasi et al., 2021). Cependant, une hypothèse suggérant que l'interaction de l'AAT avec les HDL ne serait pas médiée par l'ApoA-I mais par la présence d'autres partenaires lipidiques ou protéiques doit être confirmée (Ortiz-Muñoz et al., 2009).

L'AAT est l'inhibiteur naturel de sérine protéases telles que NE mais aussi la chymotrypsine, la cathepsine G, la protéinase 3 et la thrombine (Moreno et al., 2014; Stasi et al., 2021). Cette protéine est produite par l'organisme pour contrecarrer la production excessive de NE au niveau des sites d'inflammation. En effet, lors de la phase aiguë de l'inflammation, les taux plasmatiques en AAT sont augmentés de six fois par rapport à sa concentration basale variant de 1 à 2 mg/mL (S. M. Gordon & Remaley, 2017). Un déficit en AAT est fortement associé à un risque accru de développer un emphysème pulmonaire en raison de lésions pulmonaires causées par l'activation de la NE. L'équipe de Moreno et al. a montré que, dans un modèle murin d'emphysème pulmonaire, un traitement par voie intraveineuse de HDL enrichies en AAT pouvait réduire significativement la quantité de neutrophiles, de macrophages et de cytokines pro-inflammatoires et, parallèlement, prévenait les lésions pulmonaires (Moreno et al., 2014). L'AAT peut également inhiber la dégradation de la matrice extracellulaire des cellules musculaires lisses pour empêcher leur apoptose (Ortiz-Muñoz et al., 2009). Par ailleurs, Gordon et al. ont montré qu'un traitement de l'hypercholestérolémie à base de statine augmentait les niveaux d'AAT dans les particules de HDL et réduisait la production de cytokines par les macrophages (S. M. Gordon et al., 2015).

L'AAT sera abordée ultérieurement car, dans le cadre de l'enrichissement de nos nanoparticules de rHDL, elle représente une molécule particulièrement intéressante.

b. Composition lipidique des HDL

Les composants lipidiques représentent la moitié de la masse totale des HDL. Les phospholipides en sont les composants majeurs et représentent 40 à 60 % des lipides totaux. D'autres lipides sont également présents dans des proportions plus faibles tels que les esters de cholestérol, les triglycérides et le cholestérol libre (Kontush et al., 2013; Phillips, 2013).

Les composants lipidiques conditionnent la taille, la charge et la rigidité des particules de HDL (Schwendeman et al., 2015). De plus, ils sont essentiels au maintien du métabolisme des HDL et remplissent différentes fonctions structurelles (Yetukuri et al., 2010). Le cholestérol libre, quant à lui, est présent en surface au niveau de la monocouche tout en étant ancré dans le noyau hydrophobe (Kontush & Chapman, 2011).

Les lipides transportés par les HDL peuvent être classés en deux grandes catégories : les lipides hydrophobes neutres, regroupant les esters de cholestérol et les triglycérides, et les lipides amphipathiques tels que le cholestérol et les phospholipides. Les lipides qui se trouvent dans le cœur hydrophobe sont généralement des cargaisons, tandis que les lipides en surface sont des composants structurants des HDL (Vickers & Remaley, 2014).

Les études en spectrométrie de masse menées par Wiesner et al. ont permis de fournir des données quantitatives sur toutes les espèces lipidiques composant les HDL. Plus de 200 espèces ont été identifiées au sein des particules de HDL. Ces lipides sont regroupés dans différentes classes : les phospholipides, les sphingolipides, les lipides neutres et les lipides minoritaires (Tableau 4). Ces différentes classes lipidiques modulent la fonction, le métabolisme ainsi que l'activité enzymatique des HDL (Wiesner et al., 2009).

En effet, il a été montré que les petites particules de HDL pauvres en lipides possèdent de plus grandes capacités dans la captation du cholestérol cellulaire, dans l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion, et dans la protection des LDL contre l'oxydation par rapport aux plus grandes particules riches en lipides (Kontush et al., 2007). Skipski et al. ont montré que les différentes sous-classes de HDL ont des compositions lipidiques différentes. En effet, les HDL2 ont une teneur plus élevée en cholestérol libre et en sphingomyéline, tandis que les HDL3 contiennent plus d'acides gras libres, de diglycérides et de céramides (Skipski et al., 1967).

Tableau 4 : Composants lipidiques majeurs des HDL (traduit de Kontush et al., 2015).

Classe lipidique	Contenu lipidique des HDL %
<u>Phospholipides</u>	<u>37.4–49.3 %</u>
Phosphatidylcholine	32–35
PC-plasmalogène	2.2–3.5
LysoPC	1.4–8.1
Phosphatidyléthanolamine	0.70–0.87
PE-plasmalogène	0.54–0.87
Phosphatidylinositol	0.47–0.76
Cardiolipine	0.077–0.201
Phosphatidylsérine	0.016–0.030
Phosphatidylglycérol	0.004–0.006
Acide phosphatidique	0.006–0.009
<u>Sphingolipides</u>	<u>5.7–6.9 %</u>
Sphingomyéline	5.6–6.6
Céramide	0.022–0.097
Hexosyl Cer	0.075–0.123
Lactosyl Cer	0.037–0.060
S1P d18:1	0.015–0.046
S1P d18:0	0.007
SPC d18:1	0.001
<u>Lipides neutres</u>	<u>46.7–54.0 %</u>
Esters de cholestérol	35–37
Cholestérol libre	8.7–13.5
Triacylglycérides	2.8–3.2
Diacylglycérides	0.17–0.28
<u>Lipides mineurs</u>	
Acides gras libres	16:0, 18:0, 18:1
PC contenant de l'isoprostane	ND (IPGE2/D2-PC (36:4))

La chromatographie liquide et la spectrométrie de masse ont permis d'identifier et de quantifier les lipides présents dans les HDL. Les neuf sous classes identifiées dans les HDL classées selon l'ordre d'abondance décroissante sont : phosphatidylcholine (PC) – sphingomyéline (SM) – lysophosphatidylcholine (LysoPC) – phosphatidyléthanolamine (PE) – phosphatidylinositol (PI) – céramide – phosphatidylsérine – phosphatidylglycérol et acide phosphatidique. Les phospholipides majeurs retrouvés dans les HDL sont la PC et la SM (Camont et al., 2013; Kontush et al., 2013). Le PI, la PE et la LysoPC y sont également présents en quantité importante. Les phospholipides minoritaires sont les phosphatidylsérines, les phosphatidylglycérols, les cardiolipines et l'acide phosphatidique (Tableau 4).

❖ Phospholipides

Les phospholipides sont des lipides essentiellement membranaires qui constituent la bicouche lipidique des cellules. Ces lipides agissent comme barrière entre la cellule et son environnement et jouent un rôle important dans de nombreux processus cellulaires.

Un phospholipide est une molécule composée d'une ou deux queues d'acides gras (saturés ou insaturés) estérifiées aux positions sn-1 et sn-2 de la molécule de glycérol, et d'un acide phosphorique estérifié en position sn-3 au niveau de la tête hydrophile (Figure 14 A). Avec une queue hydrophobe et une tête hydrophile, le phospholipide présente des propriétés amphipatiques. Les acides gras sont souvent désignés par des noms spécifiques basés sur leur structure, ou selon la longueur de leur chaîne de carbone et le nombre d'insaturations (Figure 14 B). Le premier chiffre correspond au nombre de carbones constituant la chaîne d'acide gras et le deuxième chiffre correspond au nombre d'insaturations.

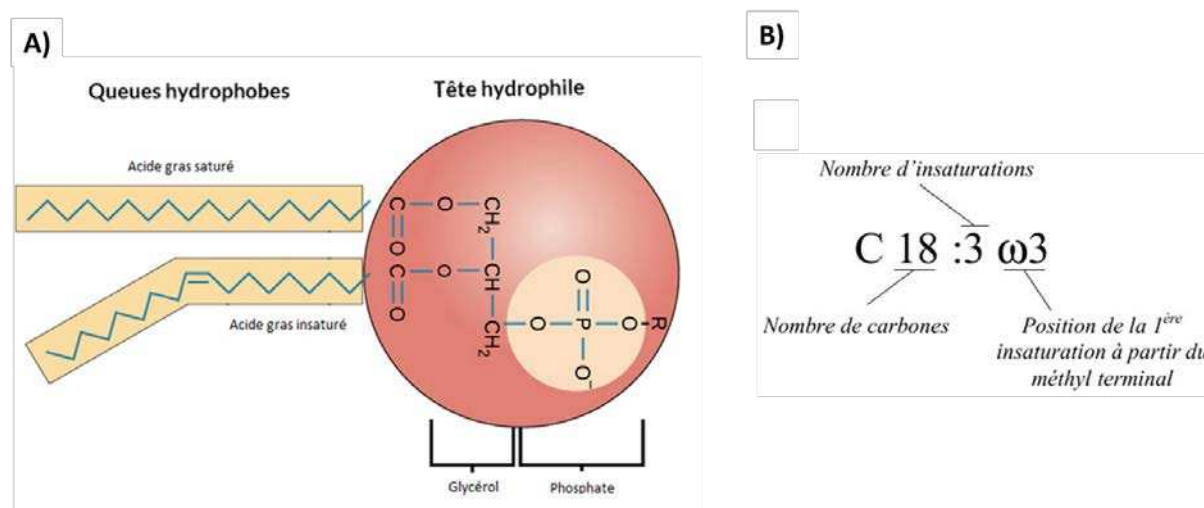


Figure 14 : Structure d'un phospholipide (A) et nomenclature abrégée des chaînes d'acides gras (B) (adapté de Khan Academy).

La composition phospholipidique des HDL joue un rôle important dans l'efflux du cholestérol. En effet, la déplétion en phospholipides des HDL *in vitro* induit une réduction de l'efflux du cholestérol cellulaire, tandis que l'enrichissement en phospholipides permet d'augmenter la capacité des HDL à éliminer le cholestérol des cellules (Jian et al., 1997). La capacité des phospholipides à induire l'efflux du cholestérol est attribuée aux propriétés amphipatiques de ces dernières, qui facilitent la captation du cholestérol libre des cellules (Fournier et al., 1997). En effet, dans les HDL, l'hydrolyse des phospholipides par la lipase hépatique favorise l'absorption hépatique des triglycérides et des esters de cholestérol. La modification de la composition en phospholipides pourrait donc avoir un impact sur le métabolisme hépatique des HDL (Kadowaki et al., 1993).

La **phosphatidylcholine (PC)** ou 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine, est un phospholipide comportant un groupe phosphocholine hydrophile en position sn-3 du glycérol. C'est le principal composant phospholipidique de toutes les classes de lipoprotéines et elle représente 70 % de la composition phospholipidique des HDL. D'ailleurs, l'altération de la biosynthèse de la PC inhibe la formation de HDL plasmatiques (Cole et al., 2012). Concernant la nature des acides gras en position sn-1 et sn-2, les espèces moléculaires de PC majoritaires sont les espèces 18:2/16:0, 18:2/18:0 et 20:4/16:0 (Kontush & Chapman, 2011). La PC est le principal phospholipide de la bile, du surfactant pulmonaire et des lipoprotéines plasmatiques (Jacobs et al., 2004), et elle est composée de deux chaînes d'acides gras hydrophobes saturés en position sn-1 et un acide gras polyinsaturé en position sn-2 au niveau de la queue (Figure 15) (Cole et al., 2012). La PC est synthétisée dans deux voies différentes. Elle peut être produite *de novo* dans la voie de la cytidine diphosphate-choline appelée voie Kennedy, qui est une voie présente dans toutes les cellules, ou par la méthylation de la PE qui a lieu uniquement au niveau des cellules hépatiques. Ces deux voies sont essentielles pour la biogenèse et l'assemblage des lipoprotéines (Kanno et al., 2007; Kontush & Chapman, 2011; Darabi et al., 2016). La PC est synthétisée dans le réticulum endoplasmique dans laquelle elle a des fonctions essentielles, notamment l'homéostasie du cholestérol et le stockage et la sécrétion du triacylglycérol. En effet, la synthèse de PC joue un rôle protecteur au niveau de la paroi artérielle. Lors de la formation de la plaque par internalisation des LDL oxydés par les macrophages, la synthèse de PC va entraîner la production de verticilles membranaires pour absorber l'excès de cholestérol (Lagace & Ridgway, 2013).

La **lysophosphatidylcholine (LysoPC)**, est un phospholipide constitué d'un seul acide gras et constitue une classe quantitativement importante de phospholipides dans les HDL (Tableau 4). Également appelée lysolécithine, elle est obtenue par l'hydrolyse de la PC par la phospholipase pancréatique A2 (PLA2) dans la lumière intestinale. Elle peut être également obtenue par le transfert d'acides gras vers le cholestérol via la LCAT. La LysoPC peut être reconvertie en PC par l'enzyme lysophosphatidylcholine acyl-transférase (LPCAT) en présence d'Acyl-CoA (Nakano et al., 2009; Law et al., 2019). La LysoPC 16:0 est présente en quantité importante dans les HDL tandis que les LysoPC 18:0 sont présentes dans les VLDL et les LDL (Kontush et al., 2013). Les niveaux de LysoPC dans la circulation sont associés au développement de l'athérosclérose et à la dysfonction endothéliale (Schmitz & Ruebsaamen, 2010).

La **phosphatidyléthanolamine (PE)** est un autre phospholipide important présent dans les HDL, représentant moins de 1 % de la masse lipidique (Tableau 4). La PE est un phospholipide connu pour ne pas former de structures en bicouche (Bonomo & Swaney, 1990; Calzada et al., 2016). Les principales PE plasmatiques sont représentées par les espèces 36:2 et 38:4, qui sont uniformément

réparties dans les VLDL, LDL et HDL (Kontush et al., 2013). La PE contribue à la synthèse hépatique de la PC (Cole et al., 2012).

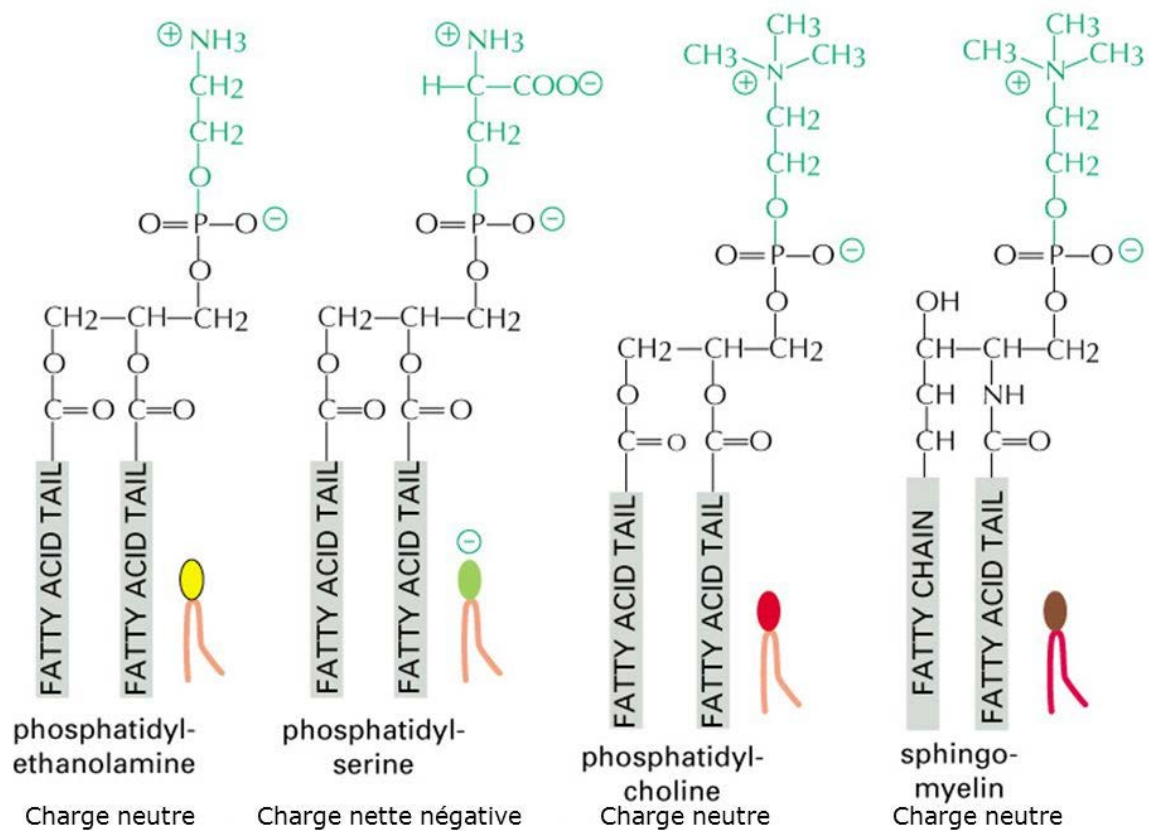


Figure 15 : Structure des phospholipides (récupéré sur *Khan Academy*).

❖ Sphingolipides

Les sphingolipides (SL) sont des composants structuraux importants pour la formation de bicouche membranaire, mais aussi pour la stabilisation des lipoprotéines. Ils contribuent à de nombreuses activités biologiques clés telles que la motilité, la croissance, la sénescence, la différenciation ainsi que la survie ou la mort cellulaire (Iessi et al., 2020). Les SL sont synthétisés *de novo* dans le réticulum endoplasmique et sont issus du catabolisme des autres SL via la voie de récupération (Iqbal et al., 2017).

Les SL sont des lipides très similaires aux phospholipides qui se distinguent par la présence de sphingosine à la place du glycérol. Ils sont, en effet, composés d'une base sphingoïde comme la sphingosine sur laquelle se lie un acide gras avec 14 à 18 atomes de carbone via une liaison amide (Figure 16) (Fasano et al., 2006).

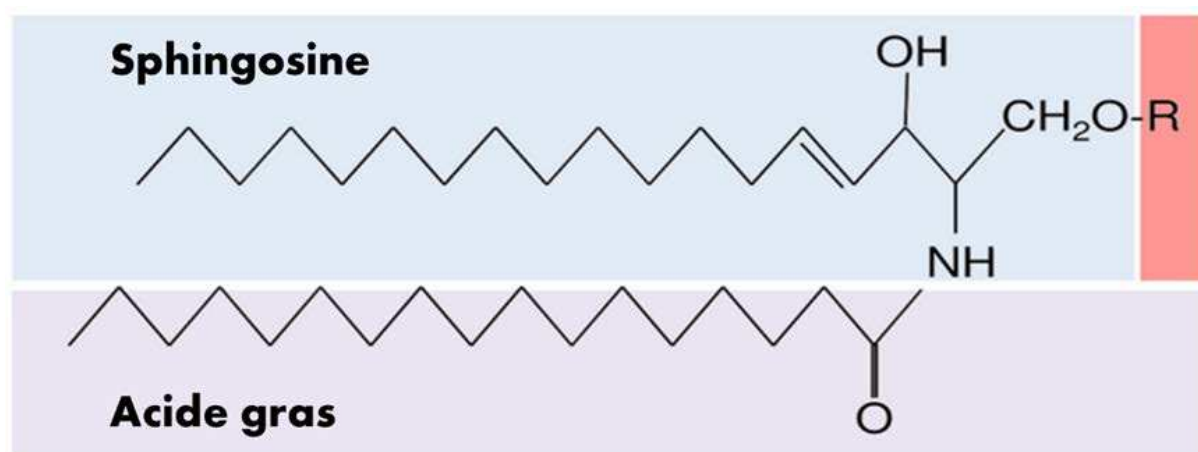


Figure 16 : Structure d'un sphingolipide (adapté de Castillo et al., 2016).

Il existe trois types de SL selon la nature du groupement hydrophile R fixé sur la fonction alcool primaire du C1 : les céramides (R= H), les SM (R= phosphorylcholine) et les glycosphingolipides (GSL; R= glucide simple ou complexe). Le métabolisme des SL comporte trois voies principales qui convergent toutes vers les céramides (Castillo et al., 2016).

Il existe plus de 200 espèces de SL retrouvées dans les HDL, dans les lipoprotéines contenant l'ApoB et dans l'albumine. Les SL s'associent aux lipoprotéines à ApoB ou à ApoA-I en intracellulaire avant leur sécrétion, ou alors par efflux depuis la membrane plasmique vers les HDL, l'albumine ou vers d'autres accepteurs extracellulaires. Les SL sont des lipides qui peuvent s'échanger entre les lipoprotéines (Iqbal et al., 2017).

La **sphingomyéline (SM)**, ou N-acyl-sphing-4-enine-1-phosphocholine, représente la classe de SL la plus abondante dans les lipoprotéines avec 65 à 75 % dans les LDL et 25 à 35 % dans les HDL (Tableau 4) (Wiesner et al., 2009; Camont et al., 2013). Elle est légèrement plus abondante dans les HDL2 que dans les HDL3 (Skipski et al., 1967; Iqbal et al., 2017). La SM est synthétisée par transfert enzymatique d'un groupe phosphocholine du PC à un céramide. En effet, la tête polaire des SM est composée d'un groupement phosphate lié à la choline (Darabi et al., 2016; Iessi et al., 2020). La présence d'un groupement choline dans la SM est la raison de son appartenance à la classe des PC (Kontush et al., 2013).

La SM est retrouvée principalement dans les lipoprotéines riches en triglycérides. Elle est transférée dans les HDL via certains transporteurs comme ABCA1. Elle peut être apportée à la circulation directement par les HDL, soit en s'associant avec l'ApoA-I libre dans l'appareil de Golgi pour être sécrétée avec les HDL naissantes, ou bien par efflux vers les HDL ou l'ApoA-I libre par le biais des transporteurs ABC extracellulaires. La SM est connue pour inhiber la LPL, la LCAT, et également l'interaction des lipoprotéines avec les récepteurs. En effet, la SM est impliquée dans la régulation de

l'efflux du cholestérol par un mécanisme qui implique les transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Castillo et al., 2016). Elle protège également les LDL de l'oxydation (Nilsson & Duan, 2006).

Les **céramides** représentent la deuxième classe de SL présents dans les HDL (Tableau 4). Ils sont sécrétés *de novo* dans le foie mais également dans tous les tissus à partir de graisses saturées et de sphingosine (Meeusen et al., 2018). En circulation, les céramides sont transportés par les lipoprotéines et représentent 3 % des SL plasmatiques. Les céramides sont transportés par les VLDL, les LDL et les HDL, et ils sont répartis de manière égale dans les lipoprotéines contenant l'ApoB et les HDL. Dans les sous-classes de HDL, la teneur en céramide diffère. En effet, les HDL2 transportent 29 % et les HDL3 23 % des céramides totaux des lipoprotéines.

Les céramides sont les unités structurelles de base présentes dans tous les tissus et sont des précurseurs clés de la synthèse des SL (Engelking, 2015). En effet, tous les SL sont catabolisés en céramides qui sont ensuite convertis en sphingosine et en S1P. Les céramides sont métabolisés à partir de deux voies : la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA et la voie de récupération (Grösch et al., 2012).

Les céramides sont des SL complexes qui jouent un rôle important dans l'intégrité de la membrane cellulaire et dans les réponses au stress cellulaire, l'inflammation et l'apoptose (Lightle et al., 2003; Meeusen et al., 2018). Ces sphingolipides présentent des effets différents dans les maladies cardiovasculaire et métabolique selon la lipoprotéine qui les transporte. En effet, il a été montré que les céramides sont impliqués dans l'inflammation, la résistance à l'insuline ainsi que dans l'altération de la fonction vasculaire entraînant des troubles métaboliques et vasculaires. Cependant, les céramides transportés par les HDL ont des propriétés opposées et semblent renforcer les propriétés anti-athérogènes des HDL (Patanapirunhakit et al., 2021).

Les HDL contiennent également d'autres SL ayant des propriétés importantes, notamment la **sphingosine-1-phosphate (S1P)**. Elle est obtenue par phosphorylation de la sphingosine par les sphingosines kinase 1 et 2. La S1P est plus abondante dans le plasma que dans les tissus. Ce SL se trouve principalement dans les HDL (50 à 60 %) et l'albumine (30 à 40 %), mais aussi en faible quantité dans les LDL (8 %) et les VLDL (3 %). La S1P n'est pas répartie de façon uniforme dans les sous-classes de HDL. En effet, les HDL3 transportent 78 % du S1P, contre 16 % dans les HDL2 (Książek et al., 2015). Christoffersen et al. ont montré que dans les HDL, la S1P est associée à l'ApoM et qu'elle présente des propriétés vasculoprotectrices (Christoffersen, 2021).

Les érythrocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales sont la principale source de S1P dans le plasma. Les cellules hématopoïétiques contribuent également à la quantité plasmatique de S1P (Iqbal

et al., 2017). La S1P est un antioxydant qui régule le tonus vasculaire et la fonction endothéliale (Salazar et al., 2015). Associée aux HDL, la S1P joue un rôle clé dans le maintien des jonctions serrées entre les cellules endothéliales qui permet de prévenir des fuites vasculaires causées par l'inflammation. Elle favorise également la survie, la prolifération et la migration de certains types cellulaires, en particulier les cellules endothéliales (Patanapirunhakit et al., 2021).

❖ Autres composants lipidiques

Parmi les autres lipides, le **cholestérol** libre fait partie de la famille des stéroïdes et représente 5 à 10 % des lipides totaux. Le cholestérol est le stéroïde dominant dans les HDL essentiel dans l'organisme. La majorité du cholestérol est produit de manière endogène, mais il peut également être apporté par l'alimentation. Le cholestérol est un constituant majeur des membranes cellulaires et il joue également un rôle essentiel dans la synthèse des hormones et la formation des synapses. D'autres stéroïdes sont présents au niveau de la monocouche lipidique en surface des HDL et sont impliqués dans la fluidité des particules (Kontush et al., 2013).

Les **esters de cholestérol** se trouvent dans le cœur hydrophobe des HDL et résultent d'une liaison ester entre le groupe hydroxyle de la structure stéroïde et un acide gras (Figure 17). Ils représentent 30 à 40 % des lipides totaux et sont majoritairement formés au sein des HDL. Les esters de cholestérol sont ensuite transférés aux lipoprotéines contenant de l'ApoB en échange de triglycérides.

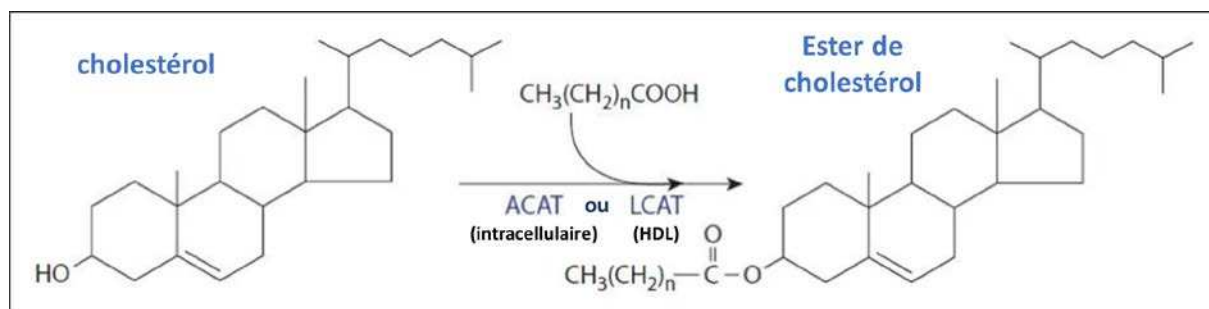


Figure 17 : Cholestérol et estérification du cholestérol catalysée par l'ACAT ou la LCAT (Adapté de themedicalbiochemistrypage, LLC).

Les **triglycérides** correspondent à l'association d'une molécule de glycérol avec trois acides gras. Les triglycérides contenus dans les HDL sont issus des lipoprotéines à ApoB, à la suite d'un échange contre des esters de cholestérol par la CETP. Les triglycérides sont produits par le foie et sont utilisés pour le stockage d'énergie dans le foie et le tissu adipeux. Ceux qui sont associés aux particules de HDL contiennent des acides oléiques, palmitiques, et linoléiques (Lhomme et al., 2012; Kontush et al., 2013).

c. Les micro-ARN associés aux HDL

En plus des lipides et des protéines, les HDL peuvent transporter d'autres molécules comme des petits ARN et des microARN (miR) (Vickers & Remaley, 2014). La plupart des fragments d'ARN contenus dans les HDL sont issus de bactéries et de champignons (Allen et al., 2018; Kajani et al., 2018). Les miRs transportés dans les HDL sont des ARN à simple brin, de petite taille, non codants, qui modulent l'homéostasie en contrôlant l'expression des gènes par le ciblage des ARN messagers, en bloquant leur traduction ou en favorisant leur dégradation (Ben-Aicha et al., 2020). Les miRs présents dans les HDL seraient associés soit à des protéines de liaison, soit à des lipides. Les miRs circulants sont relativement stables et leur association avec des transporteurs lipidiques et protéiques les protègent des ribonucléases circulantes (Vickers & Remaley, 2012).

Vickers et al. ont été les premiers à mettre en place un profil des miR chez les personnes saines et celles atteintes de dyslipidémie. Ils ont également montré que les HDL humains de sujets sains et les HDL de souris possédaient un profil de miR similaire. Les miRs des deux espèces étaient significativement altérés par l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose. De plus, ils ont montré que les ARN endogènes transportés par les HDL sont délivrés aux cellules réceptrices avec des ciblages fonctionnels (Vickers et al., 2011). En effet, les HDL transfèrent les miR aux cellules réceptrices par le récepteur SR-B1 dans les hépatocytes (Vickers et al., 2011; Allen et al., 2018).

Les miRs transportés par les HDL régulent la différenciation cellulaire, la prolifération, l'apoptose et l'homéostasie métabolique (Rohatgi et al., 2021). Le plus abondant des miRs et le mieux caractérisé dans les HDL est le miR-223. Celui-ci est libéré par les cellules myéloïdes et il est délivré par les HDL dans les cellules endothéliales, les hépatocytes, les cellules musculaires lisses et les monocytes (Cuesta Torres et al., 2019). Le miR-223 et le miR-33a ont été décrits comme ayant un effet protecteur contre l'athérosclérose en modulant la capacité de l'efflux du cholestérol et le métabolisme lipidiques (Tabet et al., 2014; Vickers & Remaley, 2014; Ono, 2016). Il existe de nombreux autres miRs dans les HDL ayant des fonctions non négligeables dans certaines pathologies (Figure 18).

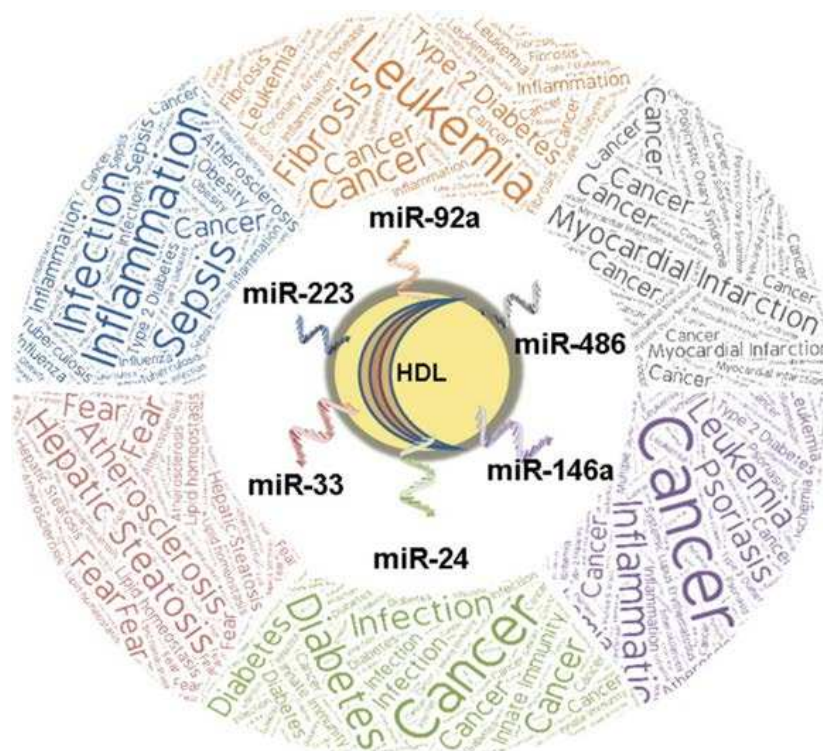


Figure 18 : Les miRs transportés par les HDL et leur impact (issue de [Michell & Vickers, 2016](#)).

d. Autres composants des HDL

De nombreuses fonctions des HDL sont liées à la présence de nombreuses molécules qu'elles transportent telles que les hormones, les vitamines et encore d'autres molécules ([Vickers & Remaley, 2014](#)).

Les HDL transportent et délivrent dans certains cas une grande variété de molécules telles que des protéines, des lipides, des vitamines, des caroténoïdes et d'autres petites molécules. Ce rôle de transport attribué aux HDL met en avant leur grand potentiel en tant que nouvelles cibles médicamenteuses dans de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir et traiter différentes pathologies.

4. Métabolisme détaillé des HDL

Nous avons déjà mentionné la corrélation qui pouvait être établie entre de faibles taux de HDL-C et l'augmentation du risque de la survenue de maladie cardiovasculaire. Cette corrélation est principalement liée au mécanisme de protection des HDL qui repose sur leur rôle dans le transfert du cholestérol en excès des tissus périphériques, en particulier des macrophages chargés en lipides vers le foie pour y être éliminé.

a. Le transport inverse du cholestérol (RCT)

Les cellules périphériques accumulent le cholestérol soit par absorption des lipoprotéines contenant des ApoB circulantes, soit par synthèse de façon endogène. Certaines cellules impliquées dans la synthèse d'hormones peuvent convertir le cholestérol en glucocorticoïdes, en œstrogènes ou encore en d'autres hormones. Cependant, la plupart des cellules ne possèdent pas le mécanisme pour cataboliser le cholestérol. Le foie est le principal organe capable d'éliminer le cholestérol excédentaire par voie biliaire soit sous forme de cholestérol libre, soit d'acides biliaires. Ce processus nommé transport inverse du cholestérol, ou RCT, a été décrit pour la première fois en 1966 (Glomset et al., 1966; Feingold, 2000).

Le RCT peut être décomposé en trois étapes : extravasculaire, intravasculaire et intrahépatique. Dans la phase extravasculaire, les petites particules contenant de l'ApoA-I vont induire l'efflux du cholestérol non estérifié à partir de la membrane cellulaire. Arrivé dans la circulation sanguine, le cholestérol associé aux HDL subit une estérification par la LCAT et les esters de cholestérol formé sont par la suite éliminés par absorption au niveau du foie par l'intermédiaire de récepteurs (N. E. Miller, 1990; Brouillette et al., 2001).

L'ApoA-I est la principale composante protéique des HDL et joue un rôle central dans le RCT. En effet, l'ApoA-I dans les préβ-HDL ou dans les HDL matures contribue à éliminer le cholestérol des macrophages et à prévenir la formation de cellules spumeuses, réduisant ainsi l'inflammation et l'athérosclérose (Linton et al., 2019).

b. Le métabolisme des HDL

La majorité des particules de HDL sont issues d'ApoA-I monomoléculaires ou partiellement lipidées provenant de trois sources potentielles. L'ApoA-I dépourvue en lipides ou partiellement lipidée joue un rôle important dans la biogenèse *de novo* des HDL (Figure 19) (Karavia et al., 2012).

La première étape du métabolisme des HDL débute par la synthèse de l'ApoA-I. L'ApoA-I est synthétisée principalement dans le foie et l'intestin. Après sa synthèse, elle est sécrétée dans la circulation sanguine soit sous forme monomoléculaire, soit très faiblement lipidée. L'ApoA-I intestinale rentre dans la circulation en association avec les chylomicrons, puis elle est rapidement transférée aux HDL. L'ApoA-I hépatique quant à elle est sécrétée dans la circulation sous forme monomoléculaire (sans lipides) ou partiellement lipidée (Karavia et al., 2012; Lüscher et al., 2014). Elle peut être également obtenue par l'hydrolyse de lipoprotéines riches en triglycérides par la LPL ou par le remodelage de particules sphériques matures de HDL (Rye & Barter, 2004; Davidson & Thompson,

2007; Lüscher et al., 2014). L'ApoA-I faiblement lipidée acquiert les phospholipides soit au sein du réticulum endoplasmique, soit par les micro-domaines situés à la surface de la cellule (Luc, 2007). Une fois sécrétée, l'ApoA-I va acquérir le cholestérol et les phospholipides qui s'écoulent des hépatocytes et des entérocytes pour former des pré- β 1-HDL qui sont des petites particules discoïdales constituées d'une bicouche lipidique et de deux molécules d'ApoA-I (Phillips, 2013). Le diamètre de ces particules varie de 7 à 13 nm et la hauteur de 4 à 5 nm, selon leur composition lipidique (Kornmueller et al., 2019). Le transporteur ABCA1 n'est pas impliqué dans la formation des pré- β 1-HDL mais il est essentiel à la transformation des pré- β 1-HDL en α -HDL (Luc, 2007). La captation du cholestérol cellulaire par les pré- β 1-HDL avec le transporteur ABCA1 nécessite une présence basale de phospholipides. En se liant avec ABCA1, les pré- β 1-HDL jouent un rôle important dans l'efflux du cholestérol cellulaire. En effet, ce transporteur présente la plus grande capacité d'efflux du cholestérol à partir des macrophages comparés à celle de ABCG1 ainsi qu'aux autres récepteurs des HDL (Camont et al., 2011). L'interaction des pré- β 1-HDL avec le transporteur ABCA1 induit l'efflux des phospholipides et du cholestérol non estérifié de nombreuses cellules comme les hépatocytes, les entérocytes et les macrophages, favorisant ainsi la formation des particules α 4-HDL (Lüscher et al., 2014). Dans la maladie de Tangier qui résulte d'une mutation perte de fonction sur le gène de l'ABCA1, les patients ne parviennent pas à lipider l'ApoA-I. Ceci entraîne un catabolisme rapide de l'ApoA-I ainsi qu'une absence totale de HDL. Des études sur des souris Knock-Out (KO) pour ABCA1 ont également montré une diminution des niveaux de HDL cholestérol dans le foie et l'intestin (Feingold, 2000). ABCA1 est une protéine composée de six domaines transmembranaires et, comme son nom l'indique, elle utilise l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie pour favoriser l'efflux du cholestérol et des phospholipides (Y. Liu & Tang, 2012; Qian et al., 2017).

Les HDL peuvent récupérer les phospholipides et le cholestérol non estérifié à partir d'autres tissus exprimant ABCA1 ou bien à partir d'autres lipoprotéines. En effet, lors de la lipolyse par la LPL, les chylomicrons et les VLDL peuvent transférer leur cholestérol, leurs phospholipides, et leurs apolipoprotéines aux HDL nouvellement formés. La PLTP permet de faciliter ce mouvement des phospholipides entre les lipoprotéines (Feingold, 2000). Les particules de HDL continuent à induire l'efflux des lipides par interaction avec d'autres transporteurs et récepteurs, incluant le transporteur ABCG1 et le récepteur SR-B1. En effet, le transporteur ABCA1 joue un rôle important dans l'efflux des lipides vers l'ApoA-I sans lipides et vers les pré- β 1-HDL, tandis que le transporteur ABCG1 et le récepteur SR-B1 sont importants dans l'exportation du cholestérol cellulaire vers les HDL matures, sphériques et de grande taille (Camont et al., 2011; Rohatgi et al., 2021). Plus l'ApoA-I devient lipidique, plus les HDL se transforment en une structure sphérique perdant leur capacité à interagir avec ABCA1 et ainsi stimuler l'efflux de cholestérol (Davidson et al., 2009; Davidson & Thompson, 2007).

L'efflux du cholestérol cellulaire vers les HDL peut s'effectuer également par diffusion passive du cholestérol (Lüscher et al., 2014; Karathanasis et al., 2017). Une étape clé du RCT est l'estérification du cholestérol par la LCAT. Le cholestérol récupéré par les HDL au sein des cellules correspondent à du cholestérol libre et se trouve à la surface des particules. Afin de former des particules de HDL sphériques matures, ce cholestérol libre doit être estérifié. Ainsi, la réaction de l'ApoA-I avec la LCAT permet de transformer les HDL discoïdales en HDL sphériques par le déplacement du cholestérol libre hydrophile, de la surface du disque vers l'intérieur sous forme d'ester de cholestérol hydrophobe. L'ApoA-I associée aux HDL est le cofacteur le plus important de la LCAT et elle est donc nécessaire pour son activité (Feingold, 2000; Brouillette et al., 2001). Les patients ayant un déficit de la LCAT présentent des taux bas de HDL-C pouvant aboutir à l'accumulation de lipides dans certains tissus et également à une anémie (McIntyre, 1988).

L'interaction des HDL avec la LCAT permet donc de transformer les particules discoïdales en particules sphériques matures (HDL3), qui sont la forme prédominante des HDL dans la circulation. Une absorption supplémentaire de cholestérol suivie d'une transformation en esters de cholestérol aboutit à la formation de grandes particules moins denses (HDL2). Ces particules sphériques riches en cholestérol sont quant à elles constituées de deux à quatre molécules d'ApoA-I (Phillips, 2013; Karathanasis et al., 2017; Kornmueller et al., 2019).

Les grandes particules de HDL2 subissent alors un remodelage par la CETP qui permet d'échanger les esters de cholestérol associés aux HDL contre des triglycérides (TG) provenant de lipoprotéines riches en TG telles que les VLDL et les LDL (Karathanasis et al., 2017; Kornmueller et al., 2019). Les patients ayant une déficience de l'activité de la CETP présentent un taux relativement élevé de HDL-C ainsi que des particules de HDL de grande taille (Feingold, 2000). La réaction induite par la CETP génère des HDL riches en triglycérides qui sont les substrats de la lipase hépatique (LH). En effet, les triglycérides contenus dans les particules de HDL sont hydrolysés par la LH ce qui conduit à l'appauvrissement de ces particules en lipides neutres et favorise donc la formation des petites particules de HDL riches en triglycérides. Parallèlement à l'hydrolyse des triglycérides, les phospholipides des HDL sont eux hydrolysés par lipase endothéliale (LE).

L'action concertée du transfert des esters de cholestérol par le CETP ainsi que de l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides respectivement par la LH et la lipase endothéliale, va induire une instabilité des particules α -HDL ou HDL2. Cette instabilité va alors favoriser l'émergence spontanée de deux nouvelles particules : une particule de petite taille pauvre en lipides (α -HDL ou HDL3) et une particule pré- β -HDL uniquement constituée de phospholipides. Au sein du compartiment intravasculaire, les α -HDL connaissent une étape de maturation supplémentaire par la protéine de

transfert PLTP qui permet le transfert des phospholipides issus de la lipolyse des LDL vers les particules de HDL.

Les petites particules sphériques HDL3 sont les partenaires préférentiels du récepteur SR-B1, le principal récepteur des HDL sur les hépatocytes (Assmann & Gotto, 2004). En effet, le cholestérol transporté par les HDL est acheminé vers le foie où il est absorbé de façon sélective par le récepteur SR-B1 sans que les particules de HDL soient internalisées ou dégradées. Ce transfert du cholestérol va induire une diminution de la taille des HDL conduisant à la formation de pré- β 1-HDL et à la libération de l'ApoA-I monomoléculaire sans lipide (Kontush & Chapman, 2011; Lüscher et al., 2014).

L'ApoA-I monomoléculaire et les pré- β 1-HDL pourront être régénérés en HDL matures par l'interaction avec ABCA1 ou bien seront filtrés par les reins. Dans cette seconde voie, l'ApoA-I est endocytée par certains récepteurs (cubiline et mégaline) et ciblée pour une dégradation lysosomale (Lüscher et al., 2014). L'ApoA-I monomoléculaire et le pré- β 1-HDL sont des accepteurs de cholestérol cellulaire et sont continuellement régénérés pour assumer leur fonction d'induction de l'efflux de cholestérol (Assmann & Gotto, 2004).

Le foie est le principal organe responsable de la clairance des particules de HDL. Cette clairance se fait soit par la captation sélective des HDL par le récepteur SR-B1, soit par transfert aux lipoprotéines à ApoB via la CETP, ou encore par captation et endocytose directement via la fixation de l'ApoA-I au complexe ecto-F1-ATPase/P2Y13 (Martinez et al., 2003; Jomard & Osto, 2020). Le cholestérol des HDL est ensuite éliminé soit sous forme libre, soit sous forme d'acides biliaires dans la bile. La présence de l'ApoE dans les HDL favorise l'absorption de la particule via le récepteur aux LDL et via d'autres récepteurs capables de reconnaître l'ApoE avant que celle-ci soit dégradée (Feingold, 2000).

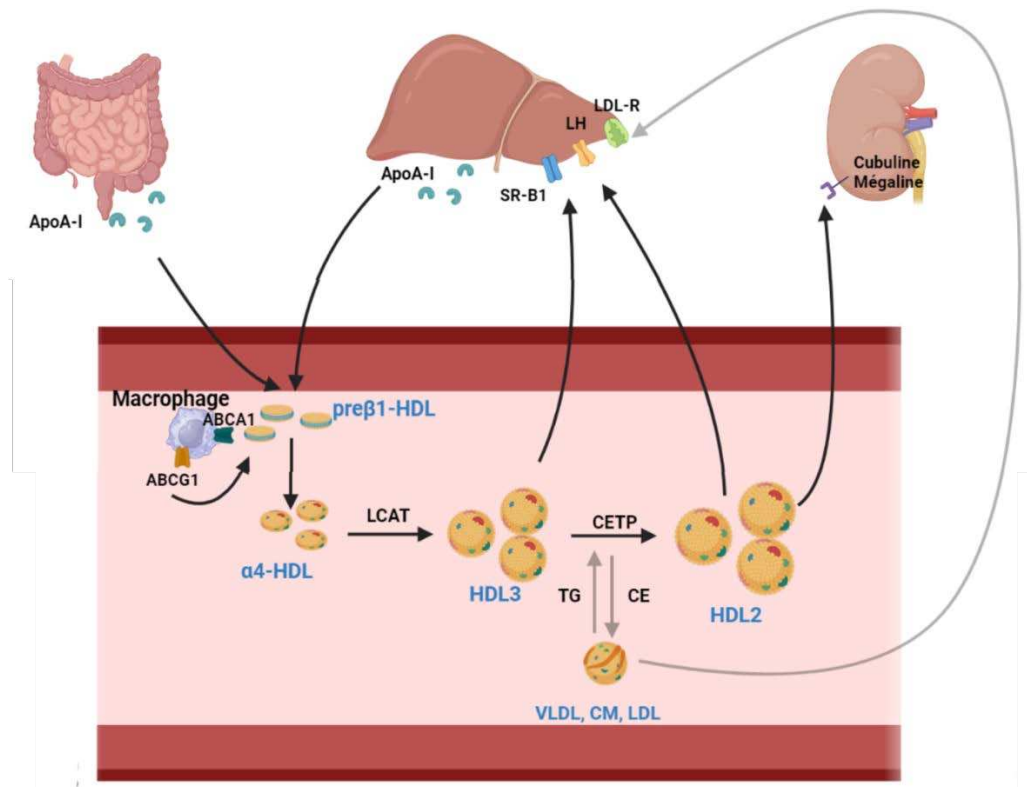


Figure 19 : Métabolisme des HDL et transport inverse du cholestérol (inspiré de Feingold, 2000).

L'implication de l'ApoA-I dans le métabolisme des HDL, que cela soit dans leur formation ou dans l'initiation du RCT, confirme son importance au sein des HDL.

II. L'apolipoprotéine A-I

L'ApoA-I est la protéine la plus abondante dans les HDL et représente 70 % de leur fraction protéique. Comme de nombreuses apolipoprotéines, elle est principalement synthétisée dans le foie (80 %) et dans l'intestin grêle (20 %) (Márquez et al., 2020; C.-K. Lee et al., 2021). La corrélation inverse entre les taux plasmatiques de HDL et le développement des maladies coronariennes a été attribuée à la fonction principale des HDL et à l'ApoA-I (Cooke et al., 2018).

Découverte à la fin des années 1960, l'apolipoprotéine A-I est une protéine d'échafaudage essentielle à la structure et à la fonction des HDL (Brewer et al., 1978; A. S. Shah et al., 2013). Elle joue un rôle important dans la stabilité des particules de HDL car son rôle est de maintenir la couche lipidique, et d'assurer la fixation d'une variété de protéines (lipases, enzymes, protéines de transfert, protéines de surface cellulaire) (A. S. Shah et al., 2013).

Comme nous venons de le voir, l'ApoA-I favorise l'efflux du cholestérol depuis la membrane plasmique des cellules périphériques vers les HDL, joue un rôle important dans l'activation de la LCAT et elle est

responsable de la reconnaissance des HDL par les récepteurs du foie (Borhani et al., 1997). En effet, l'ApoA-I augmente la réactivité de la LCAT jusqu'à 300 fois (Jonas et al., 1984). La présence de l'ApoA-I dans la particule de HDL lui confère ses effets pléiotropiques protecteurs qui seront abordés ultérieurement (Kajani et al., 2018; Bhale & Venkataraman, 2022).

1. Synthèse et maturation de l'ApoA-I

L'ApoA-I est une chaîne polypeptidique amphiphile d'une masse molaire de 28,1 kDa, composée de 243 acides aminés. Le gène codant pour l'ApoA-I est situé sur le brin négatif du chromosome 11, plus précisément au niveau du locus 11q23. Le gène de l'ApoA-I fait partie d'un cluster avec les gènes ApoC-III, ApoA-VI et ApoA-V (Kontush & Chapman, 2011). L'ApoA-I est dépourvue de glycosylation et de ponts disulfures car elle ne possède aucun résidu cystéine. La séquence de l'ApoA-I a été déterminée pour la première fois par Brewer et al. (Brewer et al., 1978). La structure du gène de l'ApoA-I révèle la présence de 8870 paires de bases composées de quatre exons et trois introns (Figure 20). L'ApoA-I est synthétisée dans le foie et l'intestin grêle sous forme d'une pré pro-ApoA-I d'une longueur de 267 acides aminés. Au cours du processus post-traductionnel, le peptide N-terminal composé de 18 acides aminés est clivé entraînant la sécrétion de la pro-ApoA-I (249 acides aminés) dans le plasma. Par la suite cette pro ApoA-I va subir un clivage protéolytique par des protéases post-traductionnelles qui va engendrer la formation de l'ApoA-I mature (Fielding & Fielding, 1995; Sviridov, 2009; Bhale & Venkataraman, 2022). Les exons 3 et 4 codent pour la totalité de la séquence de l'ApoA-I mature (Kontush & Chapman, 2011).

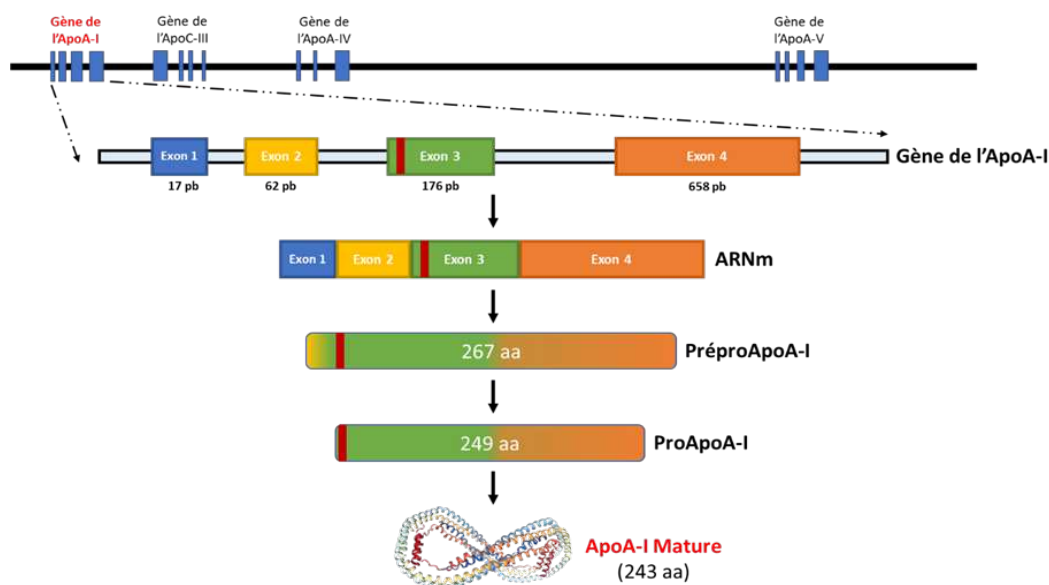


Figure 20 : Production et processus de maturation de l'ApoA-I au sein du foie et de l'intestin (adaptée de Bhale & Venkataraman, 2022).

L'ApoA-I fait partie de la famille des apolipoprotéines échangeables ApoA, ApoC et ApoE qui ont évolué à partir d'un gène ancestral commun et sont structurellement similaires (Gillotte et al., 1999). Ces protéines sont capables de migrer d'une lipoprotéine à une autre contrairement aux apolipoprotéines non échangeables (ApoB-100 et B-48) qui restent sur la même lipoprotéine depuis sa synthèse jusqu'à son catabolisme. Les protéines échangeables contiennent des répétitions en tandem de 22 acides aminés qui sont souvent séparées par un résidu proline (Segrest et al., 1992).

2. Cycle de vie de l'ApoA-I

Le cycle de vie global de l'ApoA-I est étroitement lié à celui des particules de HDL. En effet, l'ApoA-I est produite par le foie et l'intestin ou obtenue à partir de la lipolyse des lipoprotéines contenant de l'ApoB. Lors de la maturation et du remodelage des HDL suite au RCT, l'ApoA-I est éliminée ou recyclée.

Durant son cycle de vie, l'ApoA-I adopte différentes conformations selon la composition lipidique et protéique, la taille et le niveau de maturation des HDL dans lesquelles elle se trouve (Fielding & Fielding, 1995).

3. Structure et conformations de l'ApoA-I

L'ApoA-I est par conséquent une protéine avec une conformation très dynamique car elle s'adapte facilement aux changements de taille et de composition des HDL (C.-K. Lee et al., 2021). Dans le plasma, l'ApoA-I est présente sous trois conformations différentes (Figure 21), selon le type de particules HDL : l'ApoA-I monomoléculaire qui est dépourvue de lipides, l'ApoA-I au sein de HDL discoïdales aplaties contenant des lipides polaires (phospholipides et cholestérol) et l'ApoA-I dans les HDL sphériques (Fielding & Fielding, 1995). Une grande partie de l'ApoA-I circulante (> 90 %) est présente dans les particules de HDL sphériques et dans les HDL discoïdales, où elle détermine leur structure. Les particules discoïdales sont des composants mineurs de la fraction HDL du plasma et elles sont composées de deux ou trois molécules d'ApoA-I par particule. L'ApoA-I sans lipides ou partiellement lipidée est, quant à elle, présente en faible quantité (5 à 10 %) dans le plasma (Rye & Barter, 2004; Davidson & Thompson, 2007; Melchior et al., 2021). Elle existe physiologiquement dans un état instable qui favorise sa lipidation rapide (Ajees et al., 2006).

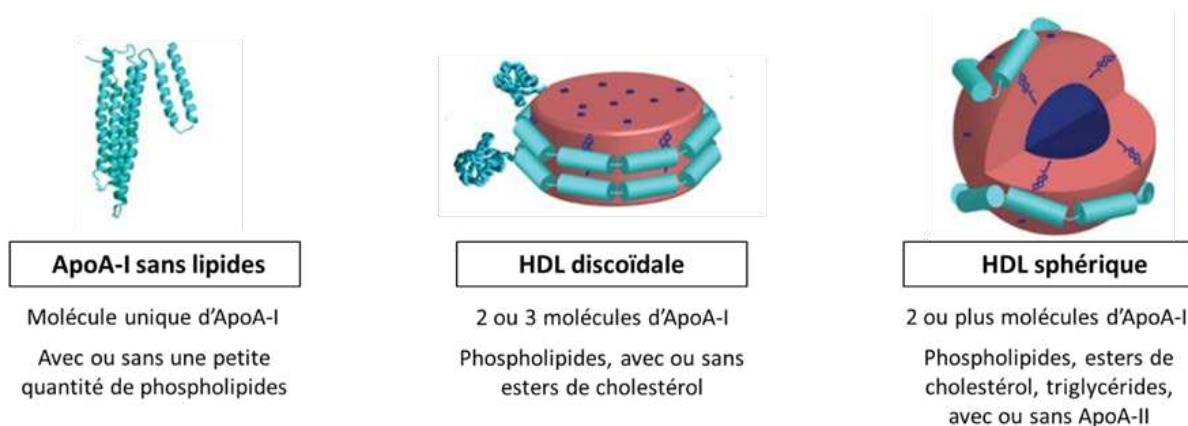


Figure 21 : Les trois formes d'ApoA-I existantes dans le plasma (adaptée de *Rye & Barter, 2004* et *Shih et al., 2009*).

a. L'ApoA-I monomoléculaire sans lipides

La structure complète de l'ApoA-I sans lipides à l'état natif n'est pas totalement décrite en raison de son instabilité et de sa grande flexibilité. Mais elle est formée de huit hélices- α amphipathiques composées chacune de 22 acides aminés et de deux répétitions de 11 acides aminés codés par les codons 44 à 243 de l'exon 4. Ces hélices sont souvent séparées par des résidus proline situés dans des régions fonctionnelles importantes qui favorisent l'interaction de l'ApoA-I avec la membrane cellulaire, initiant ainsi l'efflux du cholestérol (*Lund-Katz & Phillips, 2010; Kontush & Chapman, 2011; Bhale & Venkataraman, 2022*).

Une analyse cristallographique de l'ApoA-I monomoléculaire sans lipides a permis de montrer que l'ApoA-I est organisée en deux domaines structuraux hélicoïdaux (*Figure 22 A*). La partie N-terminale est composée d'un faisceau constitué de quatre hélices, tandis que la partie C-terminale forme une structure hélicoïdale séparée à deux hélices, moins organisée (*Saito et al., 2004; Ajees et al., 2006*). Il convient cependant de noter que cette structure a fait l'objet d'une rétractation en 2018 pour falsification/fabrication de la structure cristallographique. La structure cristalline de la forme tronquée de l'ApoA-I, dépourvue des 43 premiers acides aminés a également été décrite (*Figure 22 B*). La protéine tronquée a une structure en forme d'anneau elliptique constituée de quatre molécules d'ApoA-I disposées en α -hélices étendues et pliées. Les quatre protéines s'associent et forment un faisceau de quatre hélices via les faces hydrophobes de leurs hélices amphipathiques (*Borhani et al., 1997*).

La délétion ne semble pas avoir d'affinité pour les lipides, car la conformation de la protéine tronquée est similaire à celle de l'ApoA-I liée aux lipides. A l'état physiologique, l'ApoA-I adopte une structure

stable mais très flexible appelée « globule fondu » qui favorise sa liaison avec les lipides (Gursky & Atkinson, 1996).

Il est important de souligner que la méthode de cristallisation favorise la formation des hélices- α . En effet, à l'état cristallin, l'ApoA-I présente 80 % de formes hélicoïdales tandis que l'ApoA-I monomérique en solution en contient environ 50 % (Saito et al., 2004; Lund-Katz & Phillips, 2010). Ces régions hélicoïdales sont essentielles pour les propriétés amphipatiques de l'ApoA-I car elles facilitent la dissolution des lipides dans un environnement aqueux et permettent de stabiliser la particule (Gillotte et al., 1999).

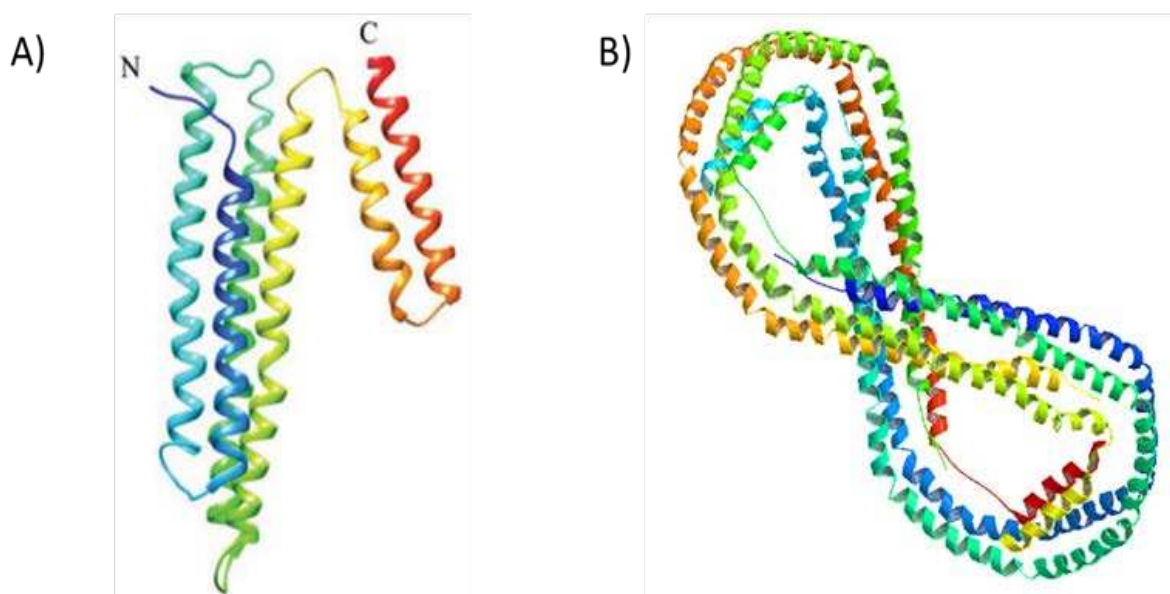


Figure 22 : Structure cristallisée de l'ApoA-I humaine à l'état non lipidé (A) de la forme pleine selon Ajees et al., 2006 et (B) de la forme tronquée de 43 résidus selon Borhani et al., 1997.

De nombreuses études ont montré que la région C-terminale de l'ApoA-I est très hydrophobe et qu'elle est importante pour la liaison avec les lipides (Gillotte et al., 1999; Saito et al., 2004), tandis que la région N-terminale joue un rôle important dans la conformation de la protéine sans lipides car elle est beaucoup moins impliquée dans les interactions hydrophobes. En raison des interactions hydrophobes entre les hélices- α , l'ApoA-I sans lipides présente une forte tendance à s'auto-associer en solution aqueuse. Dans ces conditions, l'ApoA-I forme une population hétérogène d'oligomères allant des monomères aux pentamères selon la concentration de la protéine lorsque celle-ci est supérieure à 0,1 mg/mL. Cette auto-association résulte d'une interaction entre les domaines C-terminal et N-terminal de la protéine (Silva et al., 2005). Les premières hélices situées dans la région centrale sont également importantes dans la liaison lipidique et dans la formation des HDL matures. L'hélice comprenant les résidus de 144 à 165 est importante pour l'activation de la LCAT avec une contribution des résidus 166 à 186. Pour la forme non lipidée de la protéine, les surfaces non polaires des hélices- α sont maintenues

à l'intérieur de la protéine, tandis que les surfaces polaires sont exposées à la phase aqueuse. Cet agencement favorise la propriété amphiphile de la protéine (Frank & Marcel, 2000).

b. L'ApoA-I au sein des HDL discoïdales

La capacité de l'ApoA-I à solubiliser les phospholipides et à stabiliser les particules de HDL fait de cette protéine un partenaire idéal pour ABCA1 dans l'efflux des lipides et dans la biogenèse des HDL. Les molécules d'ApoA-I possèdent des propriétés de type détergent, ce qui leur permet de solubiliser des phospholipides vésiculaires pour former des particules de HDL discoïdales avec des diamètres hydrodynamiques d'environ 10 nm (Lund-Katz & Phillips, 2010). Les HDL discoïdales sont obtenues par l'exposition de l'ApoA-I sans lipides avec le cholestérol et les phospholipides transférés via ABCA1.

Les HDL discoïdales présentes dans le plasma humain ont une durée de vie courte à cause de leur forte affinité pour la LCAT. Elles sont présentes dans la circulation à faible concentration et sont très instables. C'est pourquoi les HDL sous forme de disque ne sont pas facilement isolables, même si elles sont présentes en petites quantités dans les compartiments extra-plasmatiques (Davidson & Thompson, 2007). Cependant, des méthodes ont été mises en place pour étudier les particules discoïdales, consistant à co-incuber *in vitro* l'ApoA-I et des phospholipides (Lund-Katz et al., 2003). La particule la mieux caractérisée est une particule de 9,6 nm de diamètre composée de deux molécules d'ApoA-I et de 150 à 160 molécules de phospholipides (Lagerstedt et al., 2011).

Deux modèles ont été proposés pour la conformation de l'ApoA-I dans une particule de HDL discoïdale : la conformation en « palissade » (Figure 23 A) et celle en « ceinture » (Figure 23 B). Dans la conformation en palissade, les hélices- α de l'ApoA-I sont disposées parallèlement aux chaînes acyles des phospholipides et dans la conformation en « ceinture » les hélices- α de l'ApoA-I sont alignées perpendiculairement aux chaînes acyles (Borhani et al., 1997; Saito et al., 2004).

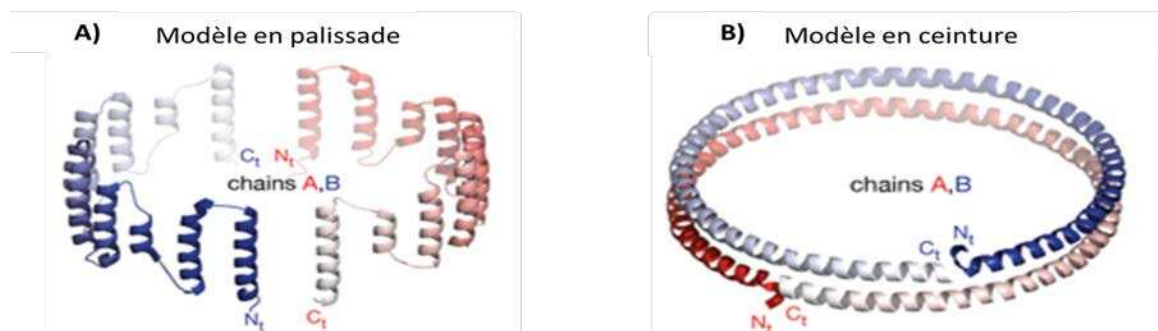


Figure 23 : Deux modèles de conformation de l'ApoA-I au sein des HDL discoïdales. A) Le modèle en palissade à partir de deux ApoA-I avec les hélices α amphipathiques orientées parallèlement aux phospholipides. B) Le modèle en ceinture de deux ApoA-I tronquées utilisé dans le modèle double ceinture proposé par Segrest et al. (1999) ; les chaînes d'ApoA-I sont orientées de manière antiparallèle aux PL (adapté de Gogonea, 2016).

Le modèle en « double ceinture » a été proposé par Segrest et al. en 1970. Dans cette conformation, les particules discoïdales de HDL sont stabilisées par deux molécules d'ApoA-I qui adoptent une conformation antiparallèle en « double ceinture » autour du bord du disque. Les deux molécules d'ApoA-I s'enroulent autour d'une bicouche phospholipidique. Elles sont stabilisées par des ponts salins intermoléculaires dans lesquels la cinquième hélice amphipatique de chaque molécule se chevauchent (modèle 5/5) (Segrest, 1977; R. Huang et al., 2011). Cette conformation permet de protéger les chaînes acyles des phospholipides de l'exposition à l'eau (Yang et al., 2018).

Cette conformation en “double ceinture” a été confirmée par la résolution de la structure en solution de particules HDL discoïdales utilisant une forme tronquée d'ApoA-I (dépourvue des résidus 1-54 N-terminaux ainsi que des résidus 121-142 qui constituent l'hélice- $\alpha 5$), en combinant la Résonance Magnétique Nucléaire, la Résonance Paramagnétique Électronique et la Microscopie Électronique à Transmission (Figure 24) (Bibow et al., 2017).

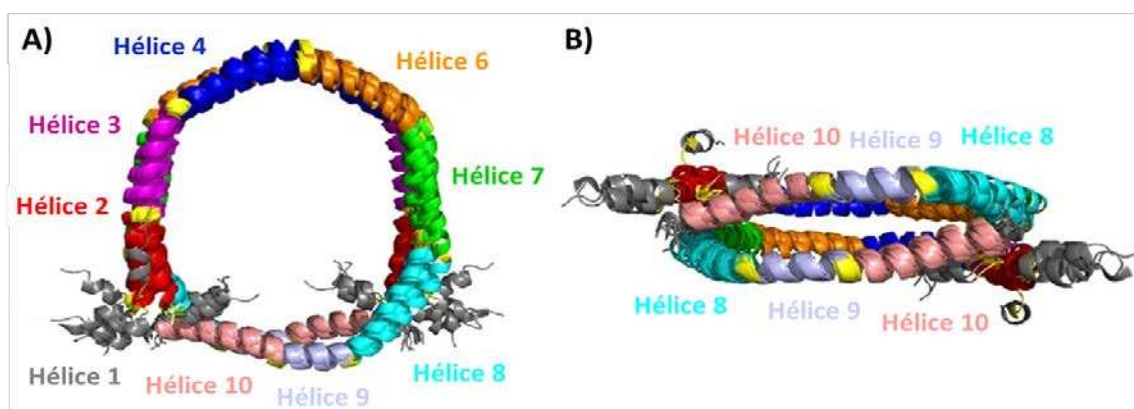


Figure 24 : Vues de dessus (A) et de côté (B) des 10 conformères d'ApoA-I tronquée au sein de particules HDL discoïdales. Deux molécules d'ApoA-I tronquées antiparallèles encerclent la bicouche lipidique (non montrée) pour former une structure possédant une symétrie d'ordre deux. Les neuf hélices de chaque monomère sont individuellement colorées et légendées. Des résidus proline ou glycine (représentés en jaune) séparent généralement les hélices individuelles. Dans le dimère, les hélices suivantes sont juxtaposées : l'hélice 4 avec l'hélice 6; les hélices 2 et 3 avec l'hélice 7; et les hélices 8 et 9 avec l'hélice 10 (d'après Bibow et al., 2017).

c. L'ApoA-I au sein des HDL sphériques

Les HDL sphériques sont la forme prédominante et la plus mature du plasma, dans lesquelles l'ester de cholestérol est transporté comme cargaison (Wu et al., 2007). Elles sont obtenues par un réassemblage des HDL discoïdales suivi de leur conversion en sphères par l'action de la LCAT (Forte et al., 1971). Chez l'Homme, l'ApoA-I est principalement présente dans deux espèces majeures de HDL sphériques : les HDL2 et les HDL3. Malgré leur abondance dans le plasma, les structures des HDL

sphériques sont peu connues par rapport à l'ApoA-I sans lipides et aux HDL discoïdales, en raison de leur complexité. Chaque HDL sphérique isolée de plasma contient de trois à cinq molécules d'ApoA-I (Yang et al., 2018). Contrairement aux HDL discoïdales, les particules de HDL sphériques n'ont pas de surface hydrophobe spécifique pour interagir avec les apolipoprotéines et contraindre leur structure (Lund-Katz & Phillips, 2010). Dans les particules sphériques, les hélices amphipathiques de l'ApoA-I se trouvent à la surface des HDL, et sont intégrées entre les molécules de PC par leur partie hydrophobe pénétrant au-delà du groupement phosphate pour interagir avec les chaînes acyles de la PC, et avec leur partie hydrophile exposée vers la phase aqueuse (Segrest et al., 1992; Davidson & Thompson, 2007). Borhani et al. ont proposé un modèle de HDL sphérique qui contient quatre molécules d'ApoA-I avec une forme ellipsoïdale, dans laquelle les protéines sont organisées en ceinture (Figure 25 A) (Borhani et al., 1997). L'organisation structurale de l'ApoA-I est globalement similaire entre les HDL sphériques et discoïdales correspondant à une conformation en « double ceinture ». Les interactions protéine-protéine qui se produisent dans cette conformation sont identiques dans les deux types de particule (Silva et al., 2008). Dans la configuration avec trois molécules d'ApoA-I par particule de HDL, il existe trois conformations possibles pour l'ApoA-I, la conformation en « trèfle » étant la plus probable (Figure 25 B). Dans ce modèle, les trois molécules d'ApoA-I présentent des conformations identiques. Elles sont pliées à 60° par l'introduction de points d'inflexion au niveau des hélices 5 et 10 et forment un modèle en « trèfle » divisant la surface de la particule en trois tranches égales de 120°. Les ponts salins intermoléculaires sont les mêmes que ceux qui existent dans le modèle à « double ceinture » d'une particule discoïdale. Les molécules d'ApoA-I dans l'arrangement en « trèfle » fournissent l'échafaudage structurel qui stabilise la particule HDL sphérique (Silva et al., 2008; Lund-Katz & Phillips, 2010).

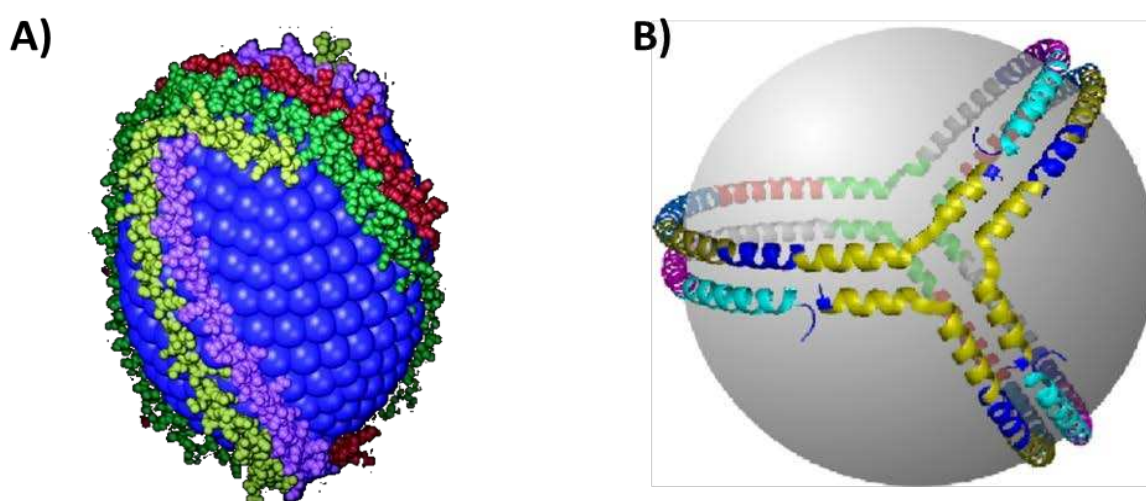


Figure 25 : Structure de l'ApoA-I humaine au sein d'une HDL sphérique. (A) Conformation sous forme ellipsoïdale selon Borhani et al., 1997 (B) Conformation en trèfle selon Silva et al., 2008.

Comme nous venons de le décrire, l'ApoA-I est essentielle dans la structure des HDL et dans leur réarrangement. L'ApoA-I est une protéine avec des fonctions structurales mais également fonctionnelles. C'est également une protéine robuste et hautement multifonctionnelle (G. et al., 2018), car elle est impliquée dans de nombreuses fonctions importantes liées au transport, au métabolisme des lipides et ses nombreuses propriétés protectrices déterminent les principales fonctions et propriétés des HDL.

4. Les effets protecteurs des HDL

Les HDL présentent une multitude de propriétés protectrices en particulier anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-apoptotiques et antithrombotiques (Karathanasis et al., 2017). Cependant, lors de maladies inflammatoires et métaboliques, les HDL deviennent dysfonctionnelles et perdent le bénéfice de ces fonctions intrinsèques (Figure 26) (Linton et al., 2019).

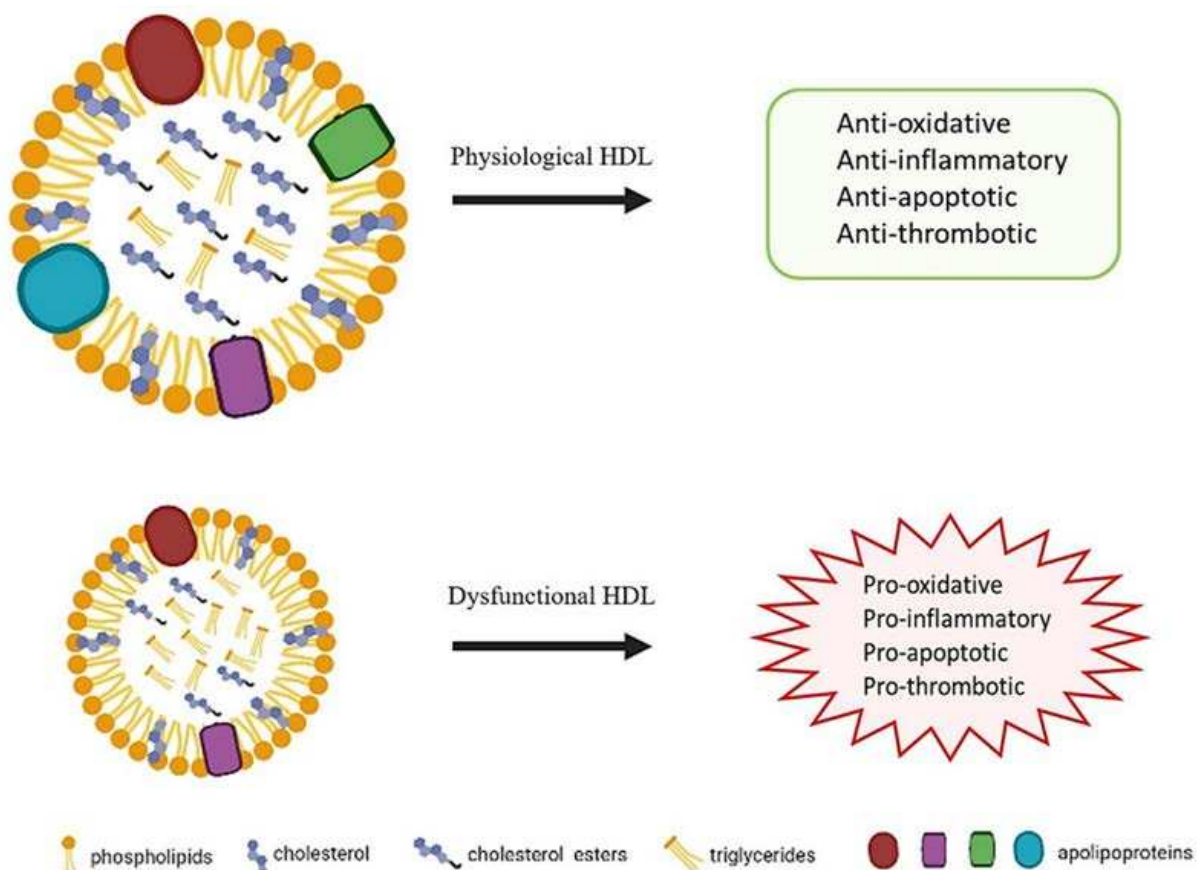


Figure 26 : Les HDL physiologiques présentent de nombreuses fonctions protectrices qui peuvent être altérées en situation pathologique (issue de Bonizzi et al., 2021).

a. Propriétés antiathérogènes

L'hypercholestérolémie favorise l'accumulation du cholestérol dans les macrophages, la formation de cellules spumeuses et, par conséquent, la formation de la plaque d'athérome. La fonction de transport inverse du cholestérol des HDL, attribuée à l'ApoA-I constitue une voie antiathérogène. En effet, le cholestérol contenu dans les membranes cellulaires des tissus périphériques est transféré aux HDL par quatre voies distinctes : par la liaison de l'ApoA-I monomoléculaire avec ABCA1, par diffusion aqueuse avec tous les types de cellules, par la liaison de l'ApoA-I avec SR-B1 et par interaction des HDL sphériques avec ABCG1. Le cholestérol est ensuite converti en ester de cholestérol par la LCAT présente sur les HDL. Les HDL riches en cholestérol seront ensuite éliminées de la circulation. Par ce processus, les HDL permettent de diminuer le taux de cholestérol au niveau des macrophages et des cellules endothéliales (Yancey et al., 2003; Rye et al., 2009).

Les HDL contribuent également au maintien de la fonction de l'endothélium vasculaire par la vasorelaxation, en favorisant la production d'oxyde nitrique (NO). La dysfonction endothéliale est induite par la diminution de la production de NO et est l'une des premières caractéristiques du développement de l'athérosclérose. Or, les HDL peuvent augmenter *in vitro* l'abondance de la protéine de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) responsable de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. De plus, ils activent la production de NO en se liant à SR-B1, activant la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt et la phosphorylation de eNOS. Enfin, les particules HDL augmentent la demi-vie, et donc l'abondance de eNOS dans les cellules endothéliales vasculaires (Rämet et al., 2003; Mineo et al., 2006; Camont et al., 2011; Tran-Dinh et al., 2013).

b. Propriétés antithrombotiques

L'activité antithrombotique des HDL est liée à sa capacité à inhiber directement l'activation, l'agrégation et la formation de thrombus plaquettaire (Pajkrt et al., 1997; P. Lerch et al., 1998; Linton et al., 2019). La prostacycline PGI₂ est une prostaglandine vasodilatatrice synthétisée par les vaisseaux sanguins qui contribue au maintien du tonus vasculaire. Elle est un puissant inhibiteur de l'activation plaquettaire, favorisant la relaxation des muscles lisses et empêchant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. La PGI₂ présente d'autres fonctions telles que l'inhibition de l'activation et de l'adhésion des leucocytes et la réduction de l'accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules de la paroi vasculaire. Les HDL augmentent la synthèse de PGI₂ par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses empêchant ainsi l'activation plaquettaire et la surexpression vasculaire du facteur tissulaire (Viñals et al., 1999). Ceci va conduire à la diminution de la synthèse de thrombine,

un puissant inducteur plaquettaire et un précurseur de la formation de la fibrine, et empêcher ainsi l'amplification de la cascade de coagulation (Mineo et al., 2006).

L'homologie structurale de l'ApoA-I avec le facteur stabilisant de la PGI₂ permet d'expliquer le rôle inducteur de l'apolipoprotéine sur la PGI₂. En raison de sa structure en hélice alpha, l'ApoA-I peut se lier à la PGI₂, la rendant ainsi plus stable. Cette propriété particulière confère aux HDL un effet protecteur contre la formation d'un thrombus plaquettaire au niveau des sites de lésions vasculaires (Yui et al., 1988).

c. Propriétés anti-inflammatoires

Les HDL réduisent l'inflammation dans plusieurs types cellulaires, notamment les cellules endothéliales et les macrophages, ce qui peut avoir des effets bénéfiques dans la progression et les complications de l'athérosclérose (Rohatgi et al., 2021).

L'athérosclérose est favorisée par des réactions inflammatoires chroniques en lien avec l'accumulation de macrophages et de lymphocytes T au niveau de l'intima des artères, associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de cytokines inflammatoires (IL-6 ou TNF α) (Barter Philip J. et al., 2004; Shindo et al., 2014). Les effets anti-inflammatoires des HDL sont dus à leur capacité à inhiber la migration trans-endothéliale des cellules immunitaires, l'activation des monocytes et la production de cytokines, la peroxydation lipidique et l'interaction avec les récepteurs de l'immunité innée (Vuilleumier et al., 2013). En effet, l'activation du facteur nucléaire kB (NF-kB) induit la sécrétion de médiateurs inflammatoires à l'origine de l'activation des cellules endothéliales et de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 et des sélectines E qui favorisent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales (Allen et al., 2018; Karathanasis et al., 2017). L'effet anti-inflammatoire induit par les HDL au niveau des macrophages et des cellules endothéliales est lié à l'inhibition de l'expression de ces molécules d'adhésion. En effet, les HDL vont activer la protéine kinase Akt qui régule l'expression de ces molécules d'adhésion. Les HDL peuvent également inhiber NF-kB suite à l'exposition à des cytokines comme le TNF α (A. Schmidt et al., 2006). De Nardo et al. ont montré que les effets anti-inflammatoires des HDL sont également favorisés par l'induction de l'activation du facteur de transcription 3 (ATF3) à l'origine de la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (De Nardo et al., 2014).

La protéine impliquée dans le recrutement des monocytes et qui constitue donc une partie importante de la composante inflammatoire de l'athérosclérose est la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1, "monocyte chemoattractant protein 1") (Gu et al., 1998). L'inhibition par les HDL de la production de MCP-1 dans les cellules endothéliales humaines et dans les cellules musculaires lisses

vasculaires murines de l'aorte a pu être montrée dans plusieurs études (Mackness et al., 2004; M. Tölle et al., 2008). Les HDL sont également connues pour inhiber la sécrétion d'IL-6, de TNF α , d'IFN γ et de médiateurs pro-inflammatoires suite à l'exposition des cellules au lipopolysaccharide (LPS) (White et al., 2017).

Associé aux HDL, l'ApoA-I présente également des effets anti-inflammatoires qui se traduisent par la libération du miR-223 dans les cellules endothéliales. En effet, la libération de ce miR induit la suppression de l'expression de VCAM-I, ICAM-I et de la sélectine E. ICAM-1 a été notamment identifiée comme une cible directe du miR-223 transféré par les HDL. Les HDL peuvent ainsi agir sur la répression traductionnelle d'ICAM-1 dans les cellules endothéliales en transférant le miR-223 aux cellules (Tabet et al., 2014). Au-delà des propriétés anti-inflammatoires conférées aux HDL, cette étude montre que l'ApoA-I a la capacité de transporter des molécules ayant des propriétés bénéfiques.

d. Propriétés antioxydantes

Les HDL possèdent également des propriétés antioxydantes en raison du grand nombre de protéines qui les constituent (Thakkar et al., 2021). Ainsi, un faible taux de HDL est associé à une augmentation du stress oxydant (Kontush et al., 2005) ou à un dysfonctionnement endothélial chez des jeunes hommes sains, dans la mesure où les HDL peuvent protéger l'endothélium et inhiber l'oxydation des LDL (Toikka et al., 1999). Cette prévention de l'oxydation des LDL par les HDL empêcherait le développement de lésions des plaques athérosclérotiques dans la paroi des artères selon une étude de Kontush et al. (Kontush et al., 2005).

La formation des LDL oxydées est un facteur majeur du développement de l'athérosclérose. En effet, l'événement déclencheur clé de l'athérosclérose est la rétention sous-endothéliale de lipoprotéines athérogènes riches en cholestérol comme les LDL (Williams & Tabas, 1998). Ces LDL retenues dans le compartiment sous-endothélial vont être oxydées dans la paroi artérielle par des enzymes telles que la myéloperoxydase (MPO), la NADPH oxydase, l'eNOS et la lipoxygénase. Ce processus oxydatif va induire l'accumulation de lipides hydroperoxydes (LOOHs) (Gaut & Heinecke, 2001; Yoshida & Kisugi, 2010) qui sont ensuite absorbés par les macrophages, conduisant à la formation de cellules spumeuses et d'une plaque lipidique. Les HDL sont les principaux transporteurs des LOOHs plasmatiques dans les modèles d'athérosclérose chez l'animal et l'homme. Ainsi, les HDL constituent une voie de passage des LOOHs pour une clairance hépatique rapide ce qui empêche l'accumulation de ces derniers dans les LDL (Bowry et al., 1992; Navab et al., 2004).

Les HDL sont également des transporteurs d'enzymes, telles que les paraoxonases PON1 et PON3, qui ont pour fonction d'hydrolyser des LOOHs qui oxydent les phospholipides. L'action des HDL va alors

limiter l'accumulation des produits de peroxydation dans les LDL et ainsi prévenir la formation de LDL oxydés. En effet, les LOOHs contenus dans les LDL vont migrer à la surface des lipoprotéines grâce à leur propriété hydrophile. Ils seront ensuite transférés aux HDL soit directement entre les monocouches, soit par la CETP pour être finalement éliminés des HDL via SR-B1 au niveau du foie (Soran et al., 2015). L'action des HDL dans l'élimination des LOOHs permet donc de réduire le stress oxydant et de prévenir les dommages induits par l'athérosclérose.

La capacité d'inhibition et de réduction des LOOHs est dépendante de la composition lipidique et protéique des particules de HDL. En effet, de nombreuses protéines au sein des HDL présentent des activités antioxydantes (ApoA-II, ApoA-IV, ApoE, ApoM, ApoD, ApoF, PON1, LCAT, et PAF-AH). Cependant, la protéine clé dans l'activité antioxydante des HDL reste l'ApoA-I (Kajani et al., 2018; Thakkar et al., 2021). Il a été effectivement montré que les résidus méthionines 112 et 148 de l'ApoA-I ont la capacité de réduire les LOOHs en lipides hydroxydes (LOH) qui sont des molécules inactives. La tyrosine 115 est également impliquée dans cette réaction d'oxydoréduction (Garner et al., 1998).

Par ailleurs, une évaluation de l'activité antioxydante des différentes sous fractions de HDL a permis de montrer une association positive entre l'activité antioxydante et la densité des sous fractions selon l'ordre suivant : HDL2b < HDL2a < HDL3a < HDL3b < HDL3c (Kontush et al., 2003). Des analyses protéomiques ont permis de mettre en évidence que les HDL3c contiennent de nombreuses protéines antioxydantes qui leur confèrent une activité antioxydante plus importante que les autres sous fractions (Davidson et al., 2009).

e. Propriétés anti-apoptotiques

Lors de l'athérosclérose, le processus de mort cellulaire se met en place en réponse à une lésion endothéliale. Les principaux facteurs induisant la mort cellulaire sont les LDLox, les cytokines pro-inflammatoires, ainsi qu'une privation de facteur de croissance (Collins et al., 1994; Suc et al., 1997). Suc et al. ont démontré qu'au niveau des cellules endothéliales aortiques bovines, les HDL, notamment par le biais de l'ApoA-I, sont capables d'empêcher l'apoptose induite par les LDLox en agissant sur la cascade de signalisation intracellulaire (Suc et al., 1997). Les HDL peuvent également limiter le processus apoptotique des cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC, "human umbilical vein endothelial cells") induit par le TNF α en empêchant l'activation des protéases CPP32 (protéines apoptotiques) dans la cascade des caspases (Sugano et al., 2000).

5. Les variants de l'ApoA-I

Nous avons pu montrer dans le chapitre précédent que les nombreuses propriétés bénéfiques des HDL sont imputables aux propriétés intrinsèques de l'ApoA-I. En raison de ses propriétés protectrices, cette protéine joue un rôle vital dans de nombreuses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires. Cependant il existe de nombreuses causes qui peuvent altérer sa fonction comme des mutations et des recombinaisons génétiques qui peuvent avoir lieu naturellement. Certaines mutations abaissent la qualité des HDL, tandis que d'autres ont un effet bénéfique dont il est possible de tirer parti dans le cadre des développements thérapeutiques (Bhale & Venkataraman!, 2022). Il existe de nombreux variants de l'ApoA-I et particulièrement des mutants naturels comme l'ApoA-I Milano, l'ApoA-I Paris et l'ApoA-I A158E.

a. L'ApoA-I Milano (ApoA-I_M)

L'ApoA-I Milano (ApoA-I_M) est le premier variant naturel de l'ApoA-I décrit. Elle a été identifiée dans les années 1970 dans une famille originaire du village de Limone sul Garda dans le nord de l'Italie. En effet, une hypertriglycéridémie significative avec une diminution importante des taux de HDL-C (7-14 mg/dL) a été observée chez trois membres de cette famille. La mutation observée correspond à une substitution d'une arginine (R) par une cystéine (C) au niveau du résidu 173 (R173C). Les porteurs de l'ApoA-I_M ont des taux plasmatiques très faibles d'ApoA-I et de HDL-C avec un taux de triglycérides normal ou modérément élevé. En dépit d'un taux faible en HDL, les porteurs de ce variant ne développent pas plus d'athérosclérose et présentent même un risque de maladies cardiovasculaires moins élevé que la normale. Parallèlement, les activités de la LPL ainsi que de la LCAT ne sont pas impactées. Par contre, les particules de HDL portant l'ApoA-I_M (HDL_M) ont une taille de 12 nm contre 9,6 nm pour des HDL sauvages (HDL_{WT}) portant la forme sauvage de l'ApoA-I (ApoA-I_{WT}) (Franceschini et al., 1980). Ceci peut s'expliquer par le fait que la mutation conduit à la formation d'homodimères et d'hétérodimères de l'ApoA-I_M avec l'ApoA-II (Matsunaga, 2014) et également à un changement structurel secondaire de l'apolipoprotéine qui apparaît bénéfique (Petrolova et al., 2014).

En effet, l'équipe de Ibanez et al. a montré que la présence de l'ApoA-I_M dans les HDL confère aux particules une activité anti-inflammatoire plus importante que celle des HDL_{WT}. Ils ont également mis en évidence que les HDL_M stabilisent mieux la plaque d'athérome que les HDL_{WT} (Ibanez et al., 2012). Des effets protecteurs de l'ApoA-I_M ont également été mis en évidence par Ducroux et al. dans un modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat. Une perfusion intraveineuse de l'ApoA-I_M 4 heures après l'occlusion a permis de réduire significativement le volume de l'infarctus (Ducroux et al., 2020).

Les effets protecteurs supérieurs de l'ApoA-I_M et des HDL_M montrent que ces particules seraient une approche thérapeutique prometteuse dans le traitement de différentes pathologies.

b. L'ApoA-I Paris (ApoA-I_P)

Un autre variant naturel de l'ApoA-I est l'**ApoA-I Paris** (ApoA-I_P). L'ApoA-I_P a été découvert chez un patient français qui présentait des taux de HDL-C bas (10 mg/dL). De la même manière que l'ApoA-I_M, l'ApoA-I_P présente une substitution d'une arginine (R) par une cystéine (C) mais au niveau du résidu 151 (R151C). Cette substitution par la cystéine confère également à l'ApoA-I_P la capacité de former des dimères. Un faible taux de HDL-C avec une absence de maladie cardiovasculaire a également été observé chez ce patient. Le déficit en HDL-C observé pour l'ApoA-I_M et l'ApoA-I_P est lié à un catabolisme rapide de ces protéines dû à la formation de dimères. Si l'activité plasmatique de la LCAT est également plus faible dans cette famille porteuse de l'ApoA-I_P, les effets anti-athérogènes n'ont pas pu être vérifiés (Bruckert et al., 1997; Klon et al., 2000). Néanmoins, Bielicki et al. ont tout de même montré que l'Apo-I_P présente une activité antioxydante distincte de l'ApoA-I_{WT} (Bielicki & Oda, 2002).

c. L'ApoA-I A158E (ApoA-I_{AE})

Mahley et al. ont également identifié un variant naturel, l'**ApoA-I A158E** (ApoA-I_{AE}), connu aussi sous le nom de ApoA-I Münster-2(B). Ce variant présente une substitution de l'alanine par une glutamine au niveau du résidu 158 (A158E) (R. Mahley et al., 1985). Ce variant a été très peu étudié, néanmoins Han et al. affirment qu'à l'état non lipidé, l'ApoA-I_{AE} présente une capacité d'auto-association importante liée à une activité moins prononcée de l'élimination des phospholipides. A l'état lipidé, ce variant forme des particules de HDL de grande taille (12 nm). De plus, la conformation de ce variant est altérée, avec un pourcentage d'hélices-α et une stabilité diminuée. Les rHDL produits à partir de ce mutant montrent également une diminution de l'activation de la LCAT (Han et al., 2005).

d. L'ApoA-I V156K (ApoA-I_{VK})

Au sein de l'ApoA-I_{WT}, les résidus 143 à 165 sont impliqués dans l'activation de la LCAT et dans la régulation de réarrangements structuraux des HDL. La valine en position 156 est également un acide aminé important dans la structure et la fonction des HDL. L'équipe de Han et al. ont alors voulu déterminer plus précisément la fonction des acides aminés voisins de la valine 156. Pour répondre à cet objectif, ils ont généré une mutation de l'ApoA-I en position 156, en substituant la valine (V) par une lysine (K). A l'état non lipidé, l'**ApoA-I V156K** (ApoA-I_{VK}) présente une activité antioxydante plus importante contre l'oxydation des LDL que l'ApoA-I_{WT} à l'état lipidé. De même, les HDL reconstitués à partir de ce variant (rHDL_{VK}) induisent un meilleur efflux du cholestérol que les HDL portant les autres

variants. Enfin, ces rHDL_{VK} ont également des effets anti-inflammatoires, activités antioxydantes et anti-athérosclérotiques importantes qui peuvent justifier leur utilisation dans les thérapies à base de HDL (K. H. Cho et al., 2006; K.-H. Cho et al., 2007; K.-H. Cho & Kim, 2009).

Tout au long de cette partie, nous avons montré que les nombreuses fonctions protectrices et métaboliques des HDL dépendent en majeure partie de l'ApoA-I en raison de son implication dans la formation, la maturation des HDL et dans ses propriétés pléiotropes. Par ailleurs, les HDL ont la capacité de transporter de nombreuses molécules qui, grâce à leurs propriétés intrinsèques, peuvent apporter un gain de fonction à la nanoparticule. Parallèlement, les mutations sur l'ApoA-I peuvent également apporter un gain dans certaines propriétés protectrices des HDL comme les activités antiathérogènes ou anti-inflammatoires.

Au vu de ces données bibliographiques, les HDL constituent donc un candidat potentiel de grand intérêt dans le développement de traitements thérapeutiques de nombreuses complications métaboliques comme les maladies cardiovasculaires ou les syndromes inflammatoires.

C. La thérapie HDL : un outil prometteur

I. La thérapie HDL : échecs, progrès et avenir

1. Augmentation pharmacologique du taux de HDL-C

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de décès dans le monde, avec 17,9 millions de décès par an selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Il a été constaté qu'un taux élevé en LDL-C est associé à un risque accru des maladies cardiovasculaires. Les thérapies visant à réduire le niveau plasmatique de LDL-C par des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase comme les statines ont permis d'obtenir une diminution significative du risque d'évènement cardiovasculaire chez les patients concernés. Cependant, un nombre important de patients connaissent des évènements cardiovasculaires en dépit d'un taux de LDL-C contrôlé (Shepherd et al., 1995; Sacks et al., 1996). Ces observations ont incité à trouver une approche alternative et en complément de la régulation du taux plasmatique du LDL-C afin de réduire les risques d'évènements cardiovasculaire.

Le rôle protecteur des HDL dans la réduction du risque de maladies cardiovasculaires a été rapporté pour la première fois en 1950 (Olson, 1998). Cela a été confirmé dans les années 1980 à travers l'étude épidémiologique de Framingham qui a mis en évidence l'association entre une faible concentration du HDL-C et un risque élevé de développement de maladies cardiovasculaires (Wilson et al., 1988). En effet, une réduction de la concentration plasmatique de HDL peut accélérer le développement de l'athérosclérose, en altérant l'élimination du cholestérol de la paroi des artères (Kingwell et al., 2014). Les fonctions protectrices des HDL comme l'effet anti-inflammatoire et le RCT, contribuent à la régression de la plaque et jouent un rôle central dans la protection contre les maladies cardiovasculaires (J. Huang et al., 2020). En se basant sur ce rôle central joué par les HDL, de nombreux travaux ont cherché à réduire le risque du développement de la maladie en augmentant pharmacologiquement les niveaux de HDL-C.

a. Les statines

Les **statines** sont des molécules hypolipémiantes principalement utilisées pour diminuer la concentration intracellulaire du cholestérol. Elles inhibent HMG-CoA réductase, une enzyme hépatique limitante dans la synthèse du cholestérol. Cette inhibition va également stimuler l'expression des récepteurs aux LDL. Cette classe de médicament peut augmenter la concentration des HDL-C de 10 à 15 % mais il a été montré que les patients sous statine avec un faible taux de HDL-C

présentent tout de même un risque plus élevé d'événements cardiovasculaires que ceux ayant un taux de HDL-C élevé. Cette observation confirme la nécessité d'une thérapeutique ciblée sur les HDL-C (Sacks, 2002; Mani & Rohatgi, 2015).

b. Les fibrates

Les **fibrates**, principalement utilisés pour réduire les triglycérides sériques, sont des agonistes de récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR α , "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors") qui exercent de nombreux effets sur le métabolisme lipidique (Staels et al., 1998). Les fibrates augmentent aussi le taux de HDL-C de 10 à 15 %, avec des avantages cliniques chez des personnes ayant un faible taux de HDL-C (Birjmohun et al., 2005). Cependant, selon le groupe d'étude ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes), l'association de fibrate et d'une statine n'induit pas une réduction plus importante du taux d'événements cardiovasculaires par rapport à l'utilisation de la statine seule (ACCORD Study Group et al., 2010).

c. La niacine

Des agents pharmacologiques, tels que la **niacine** et les inhibiteurs de la CETP, ont également été utilisés afin d'augmenter les taux de HDL-C (Mani & Rohatgi, 2015; Tall & Rader, 2018). La niacine (acide nicotinique ou vitamine B3), est le médicament le plus largement utilisé pour augmenter le taux de HDL-C. Les premières études avaient montré que le traitement à partir de la niacine limitait significativement la progression de l'athérosclérose et la survenue d'événements cardiovasculaires. En effet, le traitement de patients à la niacine combinée à une statine induit une augmentation du taux de HDL-C de 25 %, ainsi qu'une diminution des taux de triglycérides et des LDL-C respectivement de 20 % et de 12 %. Si cette étude met en évidence l'effet de la niacine sur l'augmentation des HDL-C, les données ne permettent pas de conclure sur la réduction du nombre d'événements cardiovasculaires (Birjmohun et al., 2005). D'ailleurs, l'étude AIM-HIGH (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes) a été menée sur 3 414 patients et visait à analyser l'effet de la niacine sur la réduction des événements vasculaires chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires et présentant de faibles taux de HDL-C (< 40 mg/dL chez les hommes et < 50 mg/dL chez les femmes) et sous traitement par la statine. Cette étude n'a pas montré d'avantage de la niacine dans la réduction de l'incidence des événements cardiovasculaires par rapport aux statines, et cela en dépit d'une augmentation significative des taux de HDL-C (The AIM-HIGH Investigators, 2011). Un autre essai clinique mené sur 25 673 patients, HPS2-THRIVE (Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events), mis en place pour évaluer les avantages de l'ajout de la niacine associé au laropirant et à un traitement à base de statine

chez des patient atteints d'une maladie vasculaire athérosclérotique connue, n'a pas permis non plus d'apporter une conclusion positive. En effet, l'ajout de la niacine-laropiprant à libération prolongée n'a pas permis de réduire de manière significative le risque d'événements vasculaires. De plus, ce traitement a plutôt augmenté le risque d'événements indésirables graves ([The HPS2-THRIVE Collaborative Group, 2014](#)).

d. Les inhibiteurs de la CETP

Une autre approche thérapeutique visant à augmenter le taux de HDL-C afin de développer une cardioprotection a été mise en place en utilisant des inhibiteurs de la CETP ([Tableau 5](#)). Pour rappel, la CETP est une protéine permettant de catalyser le transfert du cholestérol des HDL vers les LDL ainsi que des triglycérides des LDL vers les HDL. Les inhibiteurs de la CETP vont alors empêcher ces transferts entre les LDL et HDL maintenant le cholestérol dans les HDL. Ainsi, ces molécules présentent une bien meilleure capacité à augmenter les niveaux plasmatiques de HDL-C que la niacine ([Nicholls et al., 2008](#); [Di Bartolo et al., 2016](#)). Ces inhibiteurs de la CETP se déclinent sous forme de plusieurs molécules.

Tableau 5 : Utilisation des inhibiteurs de la CETP dans la thérapie HDL (adapté de [Kingwell et al., 2014](#); [Tall & Rader, 2018](#)).

Nom de l'essai - Molécule (développeur)	Nombre de patients	Changements au niveau lipoprotéique	Durée	Résultats
ILLUMINATE - Torcetrapib (Pfizer)	15,067 Risque cardiovasculaire élevé	HDL-C↑72% LDL-C ↓*	1-2 ans	↑ Evènement cardiovasculaire ↑ Mortalité ↑ Pression artérielle systolique
dal-OUTCOMES - Dalcetrapib (Hoffman La Roche)	15,871 Après évènement cardiovasculaire	HDL-C↑~30% LDL-C→	31 mois	Evènement cardiovasculaire → ↑ Pression artérielle systolique
ACCELERATE - Evacetrapib (Eli Lilly)	12,092 Risque cardiovasculaire élevé	HDL-C↑133% LDL-C↓*	26 mois	Evènement cardiovasculaire → ↑Pression artérielle systolique
REVEAL - Anacetrapib (Merck)	30,449 Risque cardiovasculaire élevé	HDL-C↑104% LDL-C↓17%	4.1 ans	↓Evènement coronarien ↑Pression artérielle systolique

Le **torcetrapib** utilisé lors de l'essai ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand its IMpact IN ATtherosclerotic Events) mené sur 15 067 patients, est le premier inhibiteur de la CETP développé par le groupe Pfizer. Le torcetrapib augmente l'affinité de la CETP pour les HDL, et fige le complexe dans un état qui empêche le transfert du cholestérol et des triglycérides (Clark et al., 2006). Lors de cet essai clinique de phase III, une augmentation significative du HDL-C a été observée, associée à une diminution du LDL-C. Cependant, l'essai a été interrompu prématurément car les patients sous torcetrapib présentaient une augmentation de la pression artérielle systolique pouvant augmenter le risque d'événements cardiovasculaires indésirables ainsi que la mortalité (Nicholls et al., 2008; Barter et al., 2007).

Le **dalcetrapib** et l'**évacetrapib**, ont été testés lors des essais clinique Dal-OUTCOME en 2012 et ACCELERATE (Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High Risk for Vascular Outcomes) en 2015. Le dalcetrapib n'a pas eu d'impact sur les taux de LDL-C et n'a pas réduit significativement les événements cardiovasculaires malgré une augmentation des niveaux plasmatiques de HDL-C d'environ 30 %. De plus, une augmentation de la pression artérielle systolique a été observée chez les patients sous dalcetrapib. L'évacetrapib, quant à elle, augmente deux fois la concentration du HDL-C parallèlement à une diminution d'un quart celle du LDL-C. Cependant, un risque accru d'hypertension conjugué à une augmentation de la pression artérielle a été observée chez certains patients. Les essais sur ces deux inhibiteurs ont donc été prématurément arrêtés en raison d'un manque d'efficacité et des effets indésirables observés (Nicholls et al., 2011; Schwartz et al., 2012; Lincoff et al., 2017).

L'**anacetrapib**, un inhibiteur de la CETP développé par Merck, a été utilisé lors de l'essai DEFINE (Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib) et REVEAL (randomized evaluation of the effects of anacetrapib through lipid modification) (Cannon et al., 2010; Bowman et al., 2018). L'anacetrapib est considéré comme l'inhibiteur de la CETP le plus prometteur, car il a été le seul à avoir montré une réduction des événements cardiovasculaires associés à une augmentation du taux de HDL-C. L'essai clinique REVEAL a été mené sur 30 449 patients atteints d'une maladie cardiovasculaire athérosclérotique qui ont été randomisés afin de recevoir l'anacetrapib en plus d'un traitement par l'atorvastatine. Les patients ont été suivis pendant une période médiane de 4,1 ans (HPS3/TIMI55–REVEAL Collaborative Group et al., 2017). Les effets bénéfiques observés pour l'anacetrapib semblent être plutôt liés à la diminution du taux de LDL-C qu'à l'augmentation du taux de HDL-C. Cette observation est cohérente avec une autre étude révélant que les variants génétiques réduisant la fonction de la CETP sont associés à des niveaux plus bas de l'ApoB des LDL-C et à une réduction des événements cardiovasculaires (Ference et al., 2017). Malgré les effets protecteurs de

l'anacetrapib, l'essai a été abandonné du fait de la pharmacocinétique de la molécule qui présentait un temps de demi-vie trop long en raison de son absorption et de son accumulation dans les tissus adipeux (Krishna et al., 2017; Johns et al., 2019). Avec les inhibiteurs de la CETP ou la niacine, la thérapie est basée sur l'interruption du catabolisme des HDL pour augmenter le taux de ceux-ci avec pour conséquence la production de grandes particules de HDL riches en esters de cholestérol. Ces grandes particules de HDL n'interagissent pas efficacement avec les transporteurs clés dans l'efflux du cholestérol ABCA1 et ABCG1 ce qui impacte de façon délétère leurs effets bénéfiques (Y. Huang et al., 2014).

Les essais cliniques précédemment présentés ont montré une absence d'améliorations notables des événements cardiovasculaires associée à l'apparition d'effets indésirables malgré une augmentation des niveaux de HDL-C chez les patients concernés. Cependant, il est intéressant de noter que le risque cardiovasculaire est plutôt inversement corrélé à la fonction de RCT, pour laquelle le HDL accepte le cholestérol excessif des macrophages dans les tissus périphériques et le transporte dans le foie pour élimination (Qiu et al., 2017).

2. Production endogène de HDL-C

Après avoir essayé d'augmenter les niveaux de HDL-C à l'aide de molécules pharmacologiques, des chercheurs ont privilégié la production endogène de HDL en augmentant la synthèse hépatique de l'ApoA-I.

Le **RVX-208 (apabétalone)** ou RVX000222 représente une autre classe de médicaments qui a été développée par Resverlogix Corporation et qui a pour but d'augmenter la synthèse endogène de l'ApoA-I, et par conséquent le taux de HDL-C (Nikolic et al., 2015). Le RVX-208 agit en inhibant de manière épigénétique la famille des protéines à bromodomaine et extra-terminales BET ("bromodomain and extra-terminal proteins") qui inhibent l'expression de l'ApoA-I en réprimant son gène. Le RVX-208 se lie sélectivement aux bromodomains BET et entre ainsi en compétition avec le ligand endogène (lysine acétylée) au niveau du site de liaison. L'administration du RVX-208 chez des singes verts africains induit une augmentation systémique de l'ApoA-I, du HDL-C mais également une augmentation des taux sérique de pré- β HDL appauvries en lipides avec une amélioration de l'efflux du cholestérol (Bailey et al., 2010). L'utilisation du RVX-208 chez les souris KO ApoE et hyperlipidémiques a permis de limiter la formation de la plaque d'athérome ainsi que le processus inflammatoire associé (Jahagirdar et al., 2014). Cependant, les passages aux tests cliniques n'ont pas montré son efficacité dans la réduction des événements cardiovasculaires (Ray et al., 2020). Toutefois, toutes ces études infructueuses ont conduit à une nouvelle approche thérapeutique basée davantage

sur la qualité des HDL plutôt que sur leur quantité (Di Bartolo et al., 2016; Sirtori et al., 2019). Les recherches se sont orientées sur l'impact de l'infusion directe de différentes formes d'ApoA-I sous forme de pro-protéines ou sous forme de nanoparticules de rHDL (P. K. Shah et al., 2001).

3. Approche thérapeutique basée sur les HDL reconstituées (rHDL)

a. Les HDL sont considérées comme des nanoparticules

Au cours des dernières années, la recherche s'est beaucoup intéressée à la vectorisation de molécules médicamenteuses en utilisant des nanoparticules comme système d'administration. Les nanoparticules sont des particules solides d'une taille allant de 10 à 1 000 nm et pouvant être utilisées pour modifier et améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des molécules thérapeutiques. Le principe actif d'un médicament est dissous, encapsulé, piégé ou attaché à une matrice de nanoparticules. Selon la méthode de préparation, les deux principaux types de nanoparticules sont les nanosphères et les nanocapsules (Figure 27) (Mohanraj & Chen, 2007).

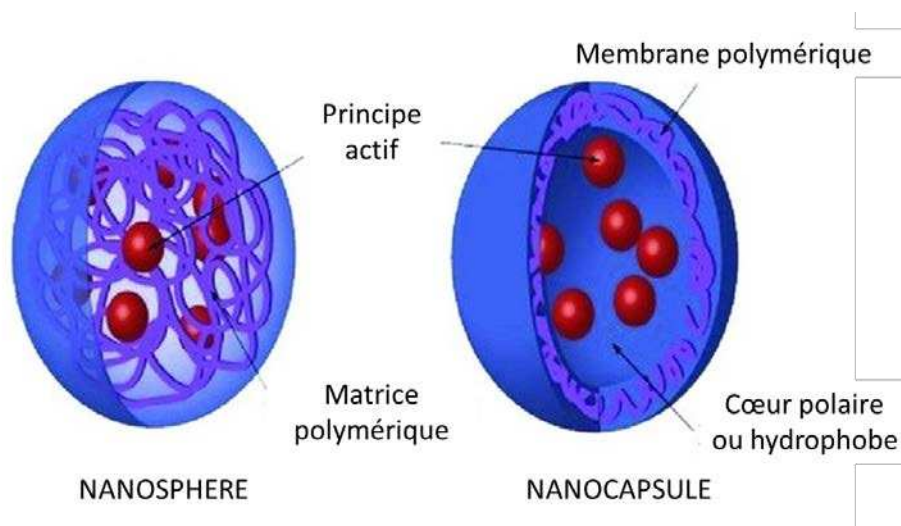


Figure 27 : Les principaux types de nanoparticules polymériques connues sous le nom de nanosphère (système matrice) et nanocapsule (système réservoir) (Adapté de Nanomedicine (2010) Future Medicine Ltd).

Il existe deux grandes catégories de nanoparticules selon leur composition chimique : les nanoparticules organiques d'origine biologique, naturelle ou synthétique et les nanoparticules inorganiques uniquement de nature synthétique. Les HDL appartiennent à la première catégorie (Khalid et al., 2020; Mitchell et al., 2021).

Les HDL qui sont naturellement présentes dans notre organisme sont considérées comme de petites nanoparticules naturelles sous forme de nanodisques composés d'une bicouche lipidique entourée et stabilisée par une protéine (Inagaki & Ghirlando, 2017). Elles représentent la plus petite classe de

lipoprotéines et peuvent donc être synthétisées *in vitro* sous forme de nanoparticules discoïdales communément appelées HDL reconstituées (rHDL) (Kornmueller et al., 2019).

En comparaison avec d'autres nanoparticules (liposomes, micelles ...), les HDL endogènes et les rHDL possèdent de nombreuses caractéristiques uniques qui font d'elles des candidates intéressantes pour l'administration optimale de molécules médicamenteuses. En effet, les HDL peuvent délivrer plus efficacement les produits transportés à destination de cibles spécifiques en raison de leur petite taille (8 à 30 nm), leur demi-vie (12 à 24 h) et de leur tolérance élevée (Kuai et al., 2016; Ma et al., 2018). Les HDL sont effectivement des particules entièrement biodégradables présentant une excellente biocompatibilité et des caractéristiques qui les distinguent des autres nanoparticules inorganiques (Ma et al., 2018; Fukuda et al., 2020). Du fait de leur origine endogène, les particules de HDL échappent à l'élimination par phagocytose et ne déclenchent pas de réponse immunologique. Par ailleurs, par le biais de l'ApoA-I, les HDL transportent des molécules depuis une cellule donneuse jusqu'à la cellule receveuse via leur interaction avec les récepteurs SR-B1, ABCA1, et ABCG1. Par exemple, SR-B1 est essentiel pour le transfert des molécules vectorisées par les HDL vers les cellules hépatiques, macrophagiques voire cancéreuses. En revanche, les nanoparticules inorganiques ne possèdent pas de récepteurs endogènes spécifiques et ne peuvent donc pas être reconnues par l'organisme de la même manière que les HDL malgré leurs tailles similaires (Kuai et al., 2016; Ma et al., 2018). En effet, l'équipe de Cormode et al. a synthétisé des nanoparticules d'or et d'oxyde de fer à base de lipides et d'ApoA-I afin de mimer les HDL. Les résultats obtenus ont montré que ces nanoparticules se sont associées efficacement avec les macrophages au niveau de la plaque athérosclérotique alors que les nanoparticules d'or et d'oxyde de fer sans ApoA-I n'ont pas présenté cette même capacité (Cormode et al., 2008).

Enfin, la grande surface des HDL leur confère la capacité à encapsuler différentes molécules hydrophobes et hydrophiles *in vivo* (Figure 28) (Uribe et al., 2021).

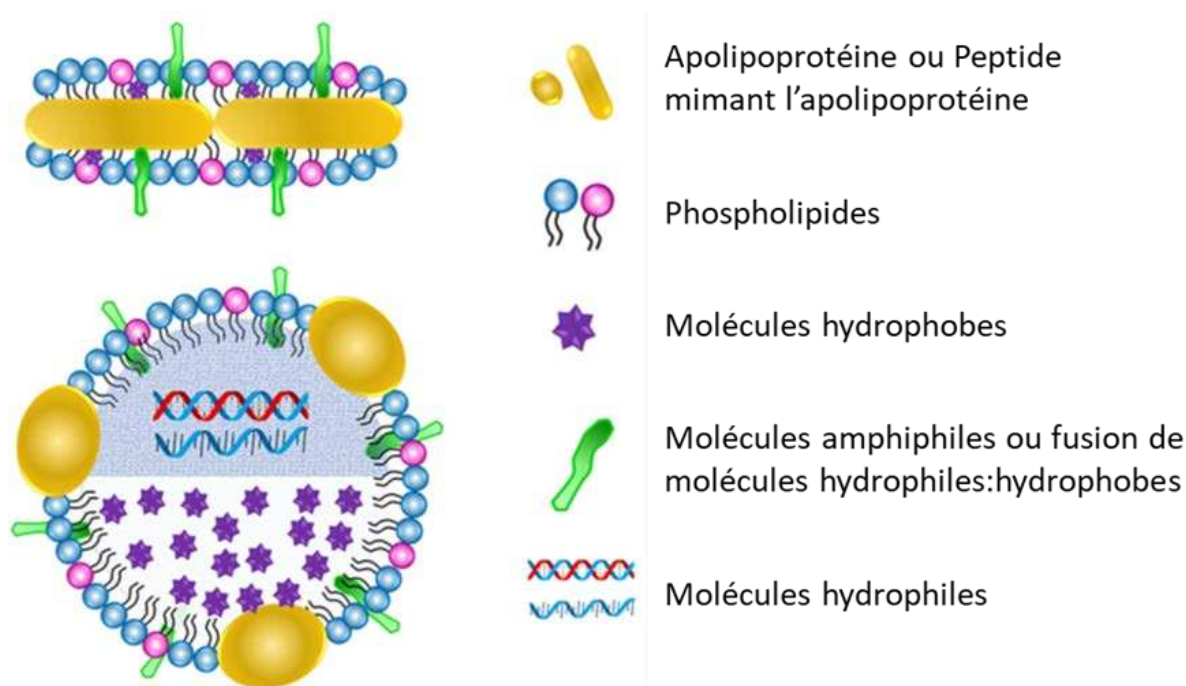


Figure 28 : Schéma représentatif d'une rHDL vecteur de molécules thérapeutiques (adapté de [Ma et al., 2018](#)).

Toutes ces caractéristiques des HDL font d'elles des candidates idéales pour le transport de médicaments. Cependant, les protocoles de purification des HDL à partir du plasma par ultracentrifugation sont complexes, laborieux et coûteux. En effet, cette purification nécessite de grandes quantités de plasma pour de faibles rendements d'ApoA-I ou de HDL, ainsi que des étapes supplémentaires de pasteurisation afin de prévenir les risques de transmission de maladies ([Ma et al., 2018](#)). Des protéines recombinantes d'ApoA-I et des peptides d'ApoA-I mimétiques ont été développées pour effectuer une reconstitution *ex vivo* de rHDL ([Kuai et al., 2016](#)). De nombreuses études se sont alors orientées vers le développement de HDL synthétiques (rHDL) en tant que vecteurs d'administration de divers agents thérapeutiques.

La reconstitution des rHDL consiste en un autoassemblage de l'ApoA-I avec des phospholipides. Grâce à l'affinité de l'ApoA-I pour les lipides, cet autoassemblage permet de former des nanodisques avec une bicouche lipidique. Ces rHDL sont généralement reconstitués à partir d'ApoA-I provenant de trois différentes sources : l'ApoA-I humaine délipidée issue du plasma, l'ApoA-I recombinante produite au sein d'une bactérie (*Escherichia coli*) ou des peptides synthétiques d'ApoA-I ([J. Huang et al., 2020](#)). Les méthodes de reconstitution des rHDL les plus utilisées seront détaillées par la suite.

b. Utilisation des rHDL dans les tests cliniques

L'idée d'utiliser les lipoprotéines à des fins thérapeutiques a été évoquée pour la première fois en 1982 ([Counsell & Pohland, 1982](#)). De nombreuses nanoparticules de rHDL différentes ont ensuite été

synthétisées et étudiées dans des études animales et par la suite dans des essais cliniques chez l'Homme. Au cours de ces dernières décennies, des approches thérapeutiques utilisant les rHDL ont été mises en place dans des essais cliniques destinés à réduire les risques cardiovasculaires. Les origines des particules de rHDL utilisés dans ces essais cliniques sont diverses : rHDL reconstituées à partir d'ApoA-I purifiée de plasma humain (SRC-rHDL, CSL-111 et CSL-112), rHDL reconstituées à partir d'ApoA-I recombinante de la forme sauvage ou de ses variants (ETC-216, MDCO-216 et CER-001), et rHDL reconstitués à partir de peptides synthétiques mimétiques de l'ApoA-I, comme ETC-642. La reconstitution de ces rHDL a été effectuée selon une formulation qui a permis d'optimiser l'efflux du cholestérol par ABCA1 (Krause & Remaley, 2013; Kuai et al., 2016; Jebari-Benslaiman et al., 2020).

❖ rHDL produits à partir d'ApoA-I purifiée de plasma

La toute première préparation de rHDL utilisée dans un essai clinique a été développée par ZLB Central Laboratory, sous le nom de **SRC-rHDL**. Les SRC-rHDL ont été reconstituées avec de l'ApoA-I purifiée de plasma humain et avec, dans un premier temps, de la dimyristoylphosphatidylcholine puis par la suite de la PC de soja. Les SRC-rHDL ont été préparées par Lerch et al selon la méthode classique au cholate de sodium en utilisant un rapport molaire ApoA-I:phospholipide de 1:150 (P. G. Lerch et al., 1996). Les essais ont été effectués pour le traitement du sepsis chez le chien, le porc et le lapin, étant donné que les HDL sont connues pour neutraliser les endotoxines souvent à l'origine de cette infection. Ensuite, de nombreuses études utilisant ces rHDL ont été menées *in vitro* et *ex vivo* et ont également pu montrer une inhibition de l'agrégation plaquettaire chez l'Homme (Krause & Remaley, 2013). Nanjee et al. ont ensuite montré que l'effet d'une perfusion unique de SRC-rHDL à 40 mg/kg chez des volontaires sains était bénéfique et que la dose était bien tolérée (Nanjee et al., 1999).

Les SRC-rHDL sont devenues en 2000 les CSL-111 suite à l'acquisition de ZLB par CSL Behring. Un vaste essai clinique de phase II nommé ERASE mené auprès de 183 patients atteints d'un syndrome coronarien aigu n'a pas permis de montrer l'efficacité d'une injection hebdomadaire de 40 mg/mL ou de 80 mg/mL de CSL-111 pendant 4 semaines par rapport au groupe placebo. L'étude a été interrompue en raison d'anomalies des fonctions hépatiques bien que la dose de 40 mg/mL soit bien tolérée (Tardif & Heinonen, 2007).

Pour ces raisons, la formulation des CSL-111 a été modifiée en **CSL-112** afin d'améliorer leur efficacité. Le rapport protéines/lipides a été modifié (2:110) avec pour conséquence la formation de particules d'environ 13 nm (J. Huang et al., 2020). Le CSL-112 a été contrôlé chez des volontaires sains avec une à plusieurs administrations et il s'est avéré beaucoup plus sûr que le CSL-111 (Gille et al., 2014). En effet, des doses plus élevées, allant jusqu'à 135 mg/kg ont été administrées et ont été bien tolérées.

Dans cet essai, les taux d'ApoA-I sont restés supérieurs à la valeur de référence pendant 3 jours après une perfusion unique de CSL-112 (Easton et al., 2014). Par la suite, l'étude clinique de phase 3, AEGIS-II (NCT 03473223), a été mise en place afin d'étudier l'innocuité et l'efficacité du CSL-112 sur une large population de plus de 17 000 personnes parmi lesquelles des sujets présentant un diagnostic de syndrome coronarien aigu et un infarctus du myocarde (Gibson et al., 2021). Cette étude se terminant à la fin du premier semestre 2022, les résultats ne sont pas encore disponibles.

❖ rHDL produits à partir d'ApoA-I recombinantes

Certains essais cliniques ont plutôt utilisé des rHDL produites à partir des ApoA-I recombinantes de la forme sauvage ou de formes mutantes.

Par exemple, les **CER-001** ont été synthétisées à partir d'ApoA-I humaine recombinante exprimée dans des cellules eucaryotes d'ovaires de hamster de Chine (CHO, "Chinese Hamster Ovary"). Les phospholipides utilisés dans la formulation des CER-001 sont la sphingomyéline (SM) et le dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG). Le rapport molaire final ApoA-I:SM:DPPG est de 1:103:3. Les CER-001 ont été testées lors d'un essai visant à déterminer l'efficacité de différentes doses hebdomadaires administrées pendant 6 semaines. Toutes les doses de CER-001 administrées par perfusion (3, 6 et 12 mg/kg) se sont avérées bien tolérées mais n'ont pas réduit l'athérosclérose coronarienne de façon significative par rapport au placebo (Tardif et al., 2014). Un autre essai clinique mené en 2015 pour évaluer l'efficacité des CER-001 sur la progression de la l'athérosclérose chez les patients traités sous statines n'a également pas produit de résultats convaincants (Nicholls, Andrews, et al., 2018).

❖ rHDL produits à partir d'un variant de l'ApoA-I recombinante

Les particules de rHDL synthétisées à partir d'un variant de l'ApoA-I sont les **ETC-216** et, plus tard, les **MDCO-216**. Les deux types de HDL ont été formulés à partir de l'ApoA-I_M produite chez *E.coli* et du 1-palmitoyl-2-oléoyl-glycéro-3-phosphocholine (POPC) pour un rapport molaire ApoA-I:POPC de 1:40. Lors d'un premier essai, l'ETC-216 s'est avérée capable de mobiliser le cholestérol corporel chez des volontaires sains et a été bien tolérée (Bisgaier et al., 2016). L'étude clinique de phase II « The ApoA-I Milano Trial » mise en place en 2003 a montré que l'administration par voie intraveineuse de l'ETC-216 favorise une régression de l'athérosclérose coronarienne chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu. Malgré ces résultats prometteurs, le développement clinique de l'ETC-216 a été interrompu en raison d'effets indésirables graves chez certains patients. Ainsi, une nouvelle formulation, le MDCO-216, a été testée et celle-ci n'a pas induit les effets indésirables observés avec

l'ETC-216 (Reijers et al., 2017). Ensuite, une étude de phase MILANO-PILOT a été mise en place afin d'évaluer l'efficacité de la perfusion de MDCO-216 chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu et traités par des statines. Cependant, l'administration de MDCO-216 associée au traitement n'a pas favorisé la régression de la plaque d'athérosclérose lorsqu'elle était associée à un traitement par statines (Nicholls, Puri, et al., 2018). Le manque d'efficacité observé lors des essais cliniques a interrompu les études concernant cette particule.

❖ rHDL produits à partir d'un peptide mimétique de l'ApoA-I recombinante

Afin de réduire les coûts et de faciliter leur production à grande échelle, certains rHDL ont été reconstitués à partir de peptides mimétiques de l'ApoA-I. La première rHDL reconstituée de cette façon et ayant fait l'objet d'un essai clinique est le **ETC-642**, dont la formulation consiste en la combinaison d'un peptide amphipatique synthétique de 22 acides aminés avec deux phospholipides naturels, la SM et la 1,2-dipalmitoyl- *sn* -glycéro-3-phosphocholine (DPPC) selon un rapport molaire de 1:3,75:3,75 (Kuai et al., 2016). Une perfusion à dose unique variant de 0,1 à 10 mg/kg chez 28 patients atteints d'athérosclérose a été effectuée lors d'une étude clinique de phase I menée en 2002. Un suivi des patients effectué 4 semaines après l'administration a révélé une augmentation du temps de demi-vie des HDL pour les doses plus élevées (M. Khan et al., 2003). Un deuxième essai de phase I réalisé sur 24 patients souffrant de maladies cardiovasculaires stables a ensuite été mené en administrant des doses plus élevées (de 10 à 30 mg/kg). Ces deux essais ont permis de démontrer que l'administration d'une dose unique de cette formulation est sans danger jusqu'à 20 mg/kg (Miles et al., 2004). Une étude à dose multiple (10, 15 et 20 mg/kg) a ensuite été menée avec une administration une fois par semaine pendant quatre semaines. Cependant, les résultats n'ont pas encore été publiés (Kuai et al., 2016).

c. L'utilisation des rHDL dans le traitement de différentes pathologies

Les rHDL sont des nanoparticules capables de surmonter plusieurs barrières biologiques. Etant donné que le rHDL est assemblé avec les mêmes constituants retrouvés dans les HDL endogènes, il est donc semblable à son homologue endogène. Les rHDL sont alors reconnues dans l'organisme comme « soi » et ne déclenchent donc pas de réponse immunitaire. Les différents potentiels thérapeutiques des rHDL font d'elles des candidates intéressantes dans le développement de nouvelles thérapies et dans le traitement de différentes pathologies. Les nanoparticules de rHDL ont été très étudiées dans le cadre de la vectorisation de molécules thérapeutiques dans le cadre de différentes pathologies (Raut et al., 2018).

❖ Utilisation des HDL dans la thérapie de l'anévrisme de l'aorte abdominale

L'aorte est la principale artère partant du cœur et traversant le thorax et l'abdomen pour irriguer tous les organes. Un anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) correspond à une dilatation permanente et localisée de l'aorte abdominale qui va aboutir à sa rupture. Les AAA sont dus à une faiblesse du tissu vasculaire notamment en lien avec l'âge ou le développement de l'athérosclérose. En effet, la présence d'une plaque d'athérome dans la portion abdominale de l'aorte va aboutir à une modification de l'aspect de la paroi provoquant sa dilatation et, par conséquent, l'anévrisme. Les patients atteints d'AAA possèdent généralement des concentrations faibles en HDL. C'est pour cette raison que l'équipe de Torsney et al. a voulu déterminer si l'augmentation du taux de HDL avait un impact sur la formation de l'AAA sur un modèle murin C57Bl/6 d'anévrisme de l'aorte abdominale en injectant par voie sous-cutanée une solution de rHDL (CSL-111). Les résultats obtenus ont montré que cette injection avait augmenté la concentration plasmatique en HDL et les colorations au Oil-Red-O et Russell-Movat's Pentachrome effectuées sur les coupes de l'aorte ont également montré une inhibition de la formation de l'AAA (Torsney et al., 2012).

Une autre étude menée par Delbosc et al. avait pour objectif de déterminer l'implication de la contamination bactérienne parodontale, par *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), dans la pathogenèse de l'AAA. Pour cela, des souris Sprague-Dawley ont reçu une perfusion intraluminale d'élastase suivie d'injections par voie intraveineuse de la bactérie *Pg* en même temps que des HDL isolées de plasma de volontaires sains. L'injection de *Pg* provoque la formation d'un thrombus riche en neutrophiles associé à la dilatation de l'aorte, thrombus qui peut être réduit significativement par les injections de HDL qui induisent une réduction de l'activation des neutrophiles ainsi qu'une diminution des niveaux de cytokines (Delbosc et al., 2016).

❖ Utilisation des HDL pour le traitement de la pathologie de Niemann-Pick de type C

La maladie de Niemann-Pick est une pathologie neurodégénérative fatale et progressive caractérisée par l'accumulation de cholestérol non estérifié dans les endosomes et les lysosomes. Les patients touchés par cette maladie présentent des mutations perte de fonction dans la protéine NPC2 et plus couramment dans NPC1. Dans le compartiment endosome/lysosome, le cholestérol non estérifié issu des LDL est lié par la protéine NPC2 pour être transféré à la protéine transmembranaire NPC1 qui exporte le cholestérol non estérifié. Les mutations de NPC1/NPC2 empêchent alors le trafic intracellulaire des lipides ce qui provoque une accumulation de cholestérol. Une production de rHDL à partir d'un peptide de l'ApoA-I a été effectuée pour être injecté par voie **intraventriculaire** chez la

souris adulte, ce qui a permis de réduire de manière significative le stockage du cholestérol dans les neurones (Schultz et al., 2019).

❖ Utilisation des HDL dans le traitement de la prolifération tumorale

Plusieurs études ont montré que SR-B1, récepteur essentiel des HDL, est surexprimé par la majorité des tumeurs malignes ce qui favorise leur prolifération, et donc leur métastase. Cette présence au niveau des cellules cancéreuses permet de mettre en place un moyen thérapeutique attractif pour l'administration de molécules (Trigatti et al., 2003; Ossoli et al., 2022), comme des nanoparticules de rHDL pour la vectorisation d'ARN interférent (ARNi) visant à inhiber l'angiogenèse par la répression du récepteur 2 du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGFR2, "vascular endothelial growth factor receptor 2"). Les VEGF sont des inducteurs puissants de l'angiogenèse et peuvent être critiques dans la progression tumorale. Une étude menée sur des souris présentant une tumeur suite à l'injection de cellules de cancer pulmonaire a permis de montrer que l'administration par **voie intraveineuse** de rHDL-ARNi permettait de réduire significativement la croissance tumorale, l'angiogenèse ainsi que l'expression de VEGFR2 dans le tissu tumoral (Tripathy et al., 2014).

Par ailleurs, Shahzad et al. ont effectué une étude dans laquelle des siARN ont été incorporés dans des particules de rHDL afin d'optimiser leur délivrance au niveau des cellules cancéreuses via SR-B1. Ces nanoparticules ont été administrées par **voie intraveineuse** ou **voie intra péritonéale** dans des modèles murins de cancer colorectal et de cancer de l'ovaire. Les résultats obtenus ont montré que les nanoparticules de rHDL ont permis une administration efficace des siARN via SR-B1 qui a pu cibler et réprimer l'expression de deux facteurs de la croissance tumorale : le transducteur de signal et activateur de la transcription 3 (STAT3, "signal transducer and activator of transcription 3") et la kinase d'adhérence focale (FAK, "focal adhesion kinase") (Shahzad et al., 2011).

Dans une autre approche thérapeutique du cancer, des chercheurs ont développé la préparation d'un nano-système ciblé avec des rHDL pouvant encapsuler et libérer l'actinium-225 (Ac-225) dont le rayonnement alpha présente un potentiel élevé dans la destruction de cellules cancéreuses (rHDL-Ac-225). Des tests *in vitro* effectués sur des lignées cellulaires cancéreuses exprimant SR-B1 (HepG2 et PC-3) ont montré que les rHDL-Ac-225 sont internalisées avec une diminution significative de la viabilité cellulaire. De plus, la biodistribution des nanoparticules suite à leur administration intra tumorale chez des souris porteuses de tumeurs HEP-G, ont montré une localisation de la radioactivité dans les masses tumorales témoignant que les rHDL représentent un système de vectorisation stable, permettant de cibler sélectivement les cellules cancéreuses exprimant SR-B1 (Hernández-Jiménez et al., 2022).

❖ Utilisation des HDL dans les maladies pulmonaires

La maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) est une maladie inflammatoire des poumons qui représente l'une des principales causes de mortalité et de morbidité dans le monde. Un facteur de risque important de la MPOC est l'exposition à des particules nocives telles que la fumée de cigarette et la pollution de l'air. La MPOC englobe plusieurs pathologies dont les principales sont la bronchite chronique et l'emphysème. L'emphysème pulmonaire est caractérisé par une destruction alvéolaire conduisant à l'élargissement de l'espace aérien. L'air reste alors emprisonné dans les tissus endommagés et empêche l'oxygène de circuler. La cause principale de l'emphysème est le tabagisme. Il est également causé par un déficit en AAT, un inhibiteur de protéase important dans la protection des poumons contre les dommages causés par l'inflammation (Moreno et al., 2014; Hayek et al., 2021). Comme décrit précédemment, l'AAT peut être transportée par les particules de HDL endogènes. L'équipe de Moreno et al. a montré que l'injection par **voie intraveineuse** de HDL enrichies en AAT chez la souris protégeait significativement du développement de l'emphysème pulmonaire comparé à de l'AAT et des HDL seules (Moreno et al., 2014).

Nous avons donc présenté de nombreuses études ayant utilisé des HDL plasmatiques ou reconstituées pour le traitement de différentes pathologies et il apparaît que les modes d'administration utilisés sont principalement la voie intraveineuse ou la voie intra péritonéale. La voie intraveineuse permet aux composés d'agir dans le compartiment vasculaire soit par le remodelage des lipoprotéines endogènes, soit par l'efflux direct de l'excès de cholestérol. Le mode d'administration choisi dans les différentes pathologies reste très important car il affecte de manière significative la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des HDL (Tang et al., 2017). Cependant, dans les pathologies respiratoires et pulmonaires, la voie d'administration la plus utilisée reste jusqu'à présent l'administration par voie intraveineuse (Moreno et al., 2014; Tanaka et al., 2022). Toutefois, la voie par aérosolisation apparaît plus pertinente, car elle permet d'atteindre directement les poumons et d'optimiser l'absorption des nanoparticules.

II. Une nouvelle voie d'administration : la voie pulmonaire

1. Généralité sur les poumons

Les poumons, organes fondamentaux du système respiratoire, ont pour fonction de permettre les échanges gazeux entre l'environnement et la circulation sanguine. On distingue les voies respiratoires supérieures des voies respiratoires inférieures, délimitées par la trachée. Ainsi, la voie supérieure se compose des cavités buccale et nasale, du pharynx et du larynx, qui conduisent l'air dans la trachée.

La voie respiratoire inférieure correspond aux tissus constituant l'intérieur des poumons (Figure 29). On y distingue une première zone de conduction de l'air, avec la trachée qui se subdivise en arbre bronchique (bronches, bronchioles, bronchioles terminales), puis une seconde zone d'échanges respiratoires (bronchioles respiratoires, conduits alvéolaires et sacs alvéolaires) (Khan & Lynch, 2022; Haddad & Sharma, 2023). Les bronches se subdivisent en bronches de petite taille appelées les bronchioles qui se terminent par de minuscules sacs alvéolaires composés de nombreux petits alvéoles (Figure 29).

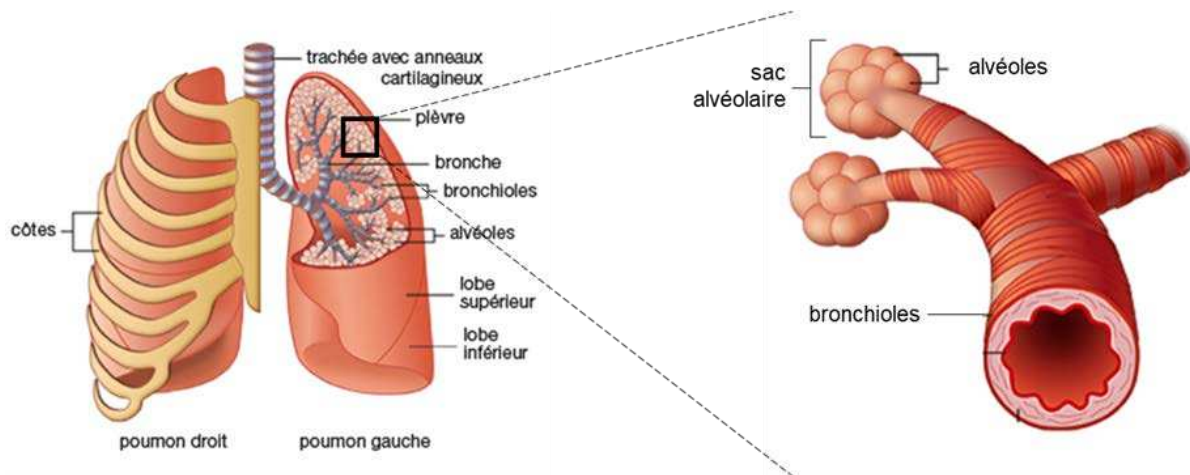


Figure 29 : Anatomie du poumon (issue du centre de *transplantation d'organe : Anatomie et physiologie*).

Des poumons sains sont composés d'environ 300 millions d'alvéoles au sein desquelles se déroulent principalement les échanges gazeux. Les alvéoles sont des unités creuses structurales et fonctionnelles du système pulmonaire et sont hautement vascularisées (Y. S. Khan & Lynch, 2022; Haddad & Sharma, 2023; Brinkman & Sharma, 2023). Les alvéoles présentent un rayon d'environ 0,1 mm, avec une épaisseur de paroi de 0,2 μm (Nkadi et al., 2009). La voie respiratoire humaine est composée d'environ 40 types de cellules, chacune ayant des fonctions spécifiques (Ganesan et al., 2013). Dans cette partie, nous allons nous focaliser uniquement sur le compartiment alvéolaire.

Dans les alvéoles se trouvent des cellules de type I, de type II, des macrophages et des fibroblastes (Figure 30). Dans la vascularisation pulmonaire sont présentes des cellules endothéliales de différentes structures vasculaires, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes adventices (Franks et al., 2008).

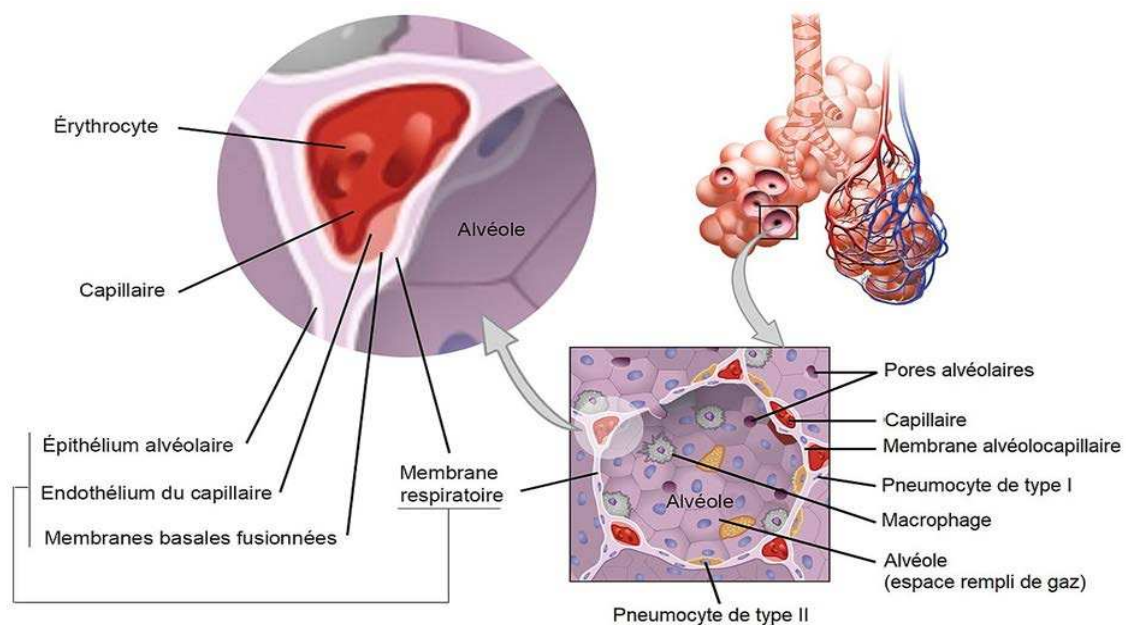


Figure 30 : Description cellulaire du compartiment et des capillaires alvéolaires (PBrieux).

La paroi alvéolaire est constituée de trois composants de surface : l'épithélium de surface, le tissu de soutien et un vaste réseau de capillaires. Les capillaires sont entourés d'un réseau de fibres d'élastine. Les alvéoles adjacentes sont reliées par des fibres de collagène avec une couche d'épithélium squameux. Les fibres d'élastine permettent la dilatation des alvéoles lors de l'inspiration (contraction du diaphragme) et une réduction des alvéoles à l'expiration (relâchement du diaphragme) (Y. S. Khan & Lynch, 2022). Les alvéoles pulmonaires sont tapissées par deux types de cellules épithéliales alvéolaires : de type I (AEC1) et de type II (AEC2), qui ont chacune des fonctions spécifiques.

Les AEC1 sont des petites cellules squameuses et aplaties et représentent 8 % des cellules pulmonaires périphériques. Elles couvrent environ 95 % de la superficie alvéolaire totale et forment la paroi alvéolaire. Elles sont présentes près du lit capillaire et servent de barrière de diffusion pour les échanges d'oxygène et de dioxyde de carbone entre les espaces alvéolaires et les capillaires. Lors d'une lésion, les AEC1 ne prolifèrent pas mais sont remplacées par les AEC2 qui se différencient en AEC1 (Bates et al., 2008; Yu et al., 2017; Y. S. Khan & Lynch, 2022).

Les AEC2 sont des petites cellules cubiques, situées au coin des alvéoles, et sont plus nombreuses que les AEC1. Elles représentent 14 % de toutes les cellules pulmonaires et recouvrent 5 % de la surface interne alvéolaire. Les AEC2 synthétisent et libèrent des protéines tensioactives (SP, "surfactant protein") A, B, C et D, et sont remplies de corps lamellaires, des organites responsables de la production et du renouvellement du surfactant pulmonaire. Le surfactant pulmonaire est une substance composée de 90 % de lipides et de 10 % de protéines qui tapissent les alvéoles pulmonaires (Figure 31). En raison de leur forme sphérique, les alvéoles ont tendance à s'effondrer. Le surfactant

permet alors de maintenir l'ouverture des alvéoles et de réduire la tension superficielle au sein de l'alvéole. Les composants lipidiques du surfactant contrôlent également l'immunité pulmonaire (Bates et al., 2008; Agassandian & Mallampalli, 2013; Yu et al., 2017; Hayek et al., 2021; Y. S. Khan & Lynch, 2022).

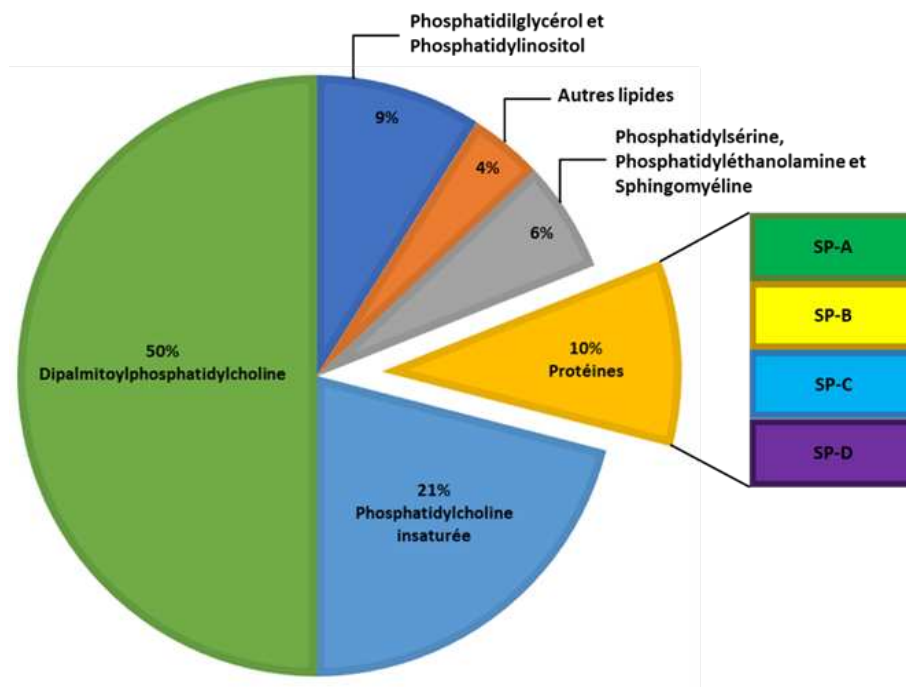


Figure 31 : Composition lipidique et protéique du surfactant alvéolaire (traduit de Agassandian & Mallampalli, 2013).

Des macrophages sont présents dans la lumière de l'alvéole et sont la première ligne de défense contre les infections pulmonaires. Ils sont soit libres, soit connectés à l'espace alvéolaire. Ils ont pour fonction de phagocyter les particules venant de l'environnement comme le carbone, la poussière ou encore les micro-organismes, mais aussi de limiter les dommages tissulaires pulmonaires causés par des infections (Allard et al., 2018).

2. ApoA-I, HDL et poumons

Pendant longtemps, les poumons n'étaient pas considérés comme sensibles aux lipoprotéines circulantes et au cholestérol qu'elles transportent. Désormais, le rôle important et unique des lipoprotéines sériques dans la biologie pulmonaire a été mis en évidence dans plusieurs études. Il a été notamment montré que les LDL et les HDL sont impliquées dans la production de surfactant pulmonaire par les cellules épithéliales alvéolaires de type II, ainsi que dans la croissance des fibroblastes pulmonaires (Björkerud & Björkerud, 1994; Pian & Dobbs, 1997). De plus, une étude clinique a montré que les patients souffrant de MPOC présentent des taux sanguins élevés de LDL et faibles de HDL (Zafirova-Ivanovska et al., 2016). La même observation a été effectuée dans une étude

menée chez des patients atteints de cancer dans laquelle les malades présentaient une concentration de HDL-C plus faibles que chez les sujets sains (Siemianowicz et al., 2000). La production d'ApoA-I, dont l'expression est déjà élevée dans le poumon foetal murin, module la maturation pulmonaire par le métabolisme lipidique au cours du développement embryonnaire (Provost et al., 2009). Cette apolipoprotéine est exprimée par différentes cellules pulmonaires telles que les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires (E. M. Gordon et al., 2016).

Le système pulmonaire, notamment le surfactant alvéolaire, est la cible principale de la toxicité causée par une exposition prolongée à l'oxygène (Kolleck et al., 1999). Cible privilégiée des espèces réactives de l'oxygène (ROS, "reactive oxygen species"), les antioxydants lipophiles du surfactant alvéolaire peuvent jouer un rôle protecteur important contre l'oxydation. En particulier, la vitamine E, un antioxydant lipophile important, prévient contre des dommages tissulaires induits par les espèces oxydantes (A. Tölle et al., 1997; Garg & Lee, 2022). Kolleck et al. ont démontré que les pneumocytes de type II expriment le récepteur SR-B1 et que la principale source de vitamine E pour les pneumocytes de type II sont les HDL (Kolleck et al., 1999, 2002). Par ailleurs, Yu et al. ont montré que les HDL favorisent la prolifération et la migration des cellules AEC2 chez le rat associées à une diminution de la sécrétion du TNF α et de IL-1 α , suggérant un rôle anti-inflammatoire des HDL dans le poumon (Yu et al., 2017). De façon intéressante, la protéine de transport du cholestérol ABCA1 est également fortement exprimée dans les poumons, en particulier dans les cellules AEC1 et AEC2, les macrophages alvéolaires, les cellules endothéliales vasculaires pulmonaires et les cellules musculaires lisses des voies respiratoires (Tableau 6 et Figure 32) (Bates et al., 2008; Chai et al., 2017). Deux autres transporteurs lipidiques sont aussi exprimés au niveau des cellules pulmonaires, à savoir ABCG1, impliqué dans le RCT, et ABCA3, un exportateur de phospholipides impliqué dans la production de surfactant pulmonaire (Tableau 6). Contrairement à ABCA1 et ABCG1, le transporteur ABCA3 est exclusivement exprimé dans les corps lamellaires des AEC2. L'absence des transporteurs ABC dans les poumons perturbe l'homéostasie lipidique et diminue la production de surfactant, ce qui induit une inflammation au niveau des cellules pulmonaires (Chai et al., 2017).

Tableau 6 : Expression cellulaire des transporteurs ABC dans les poumons de mammifères (adapté et traduit de Chai et al., 2017).

Transporteurs	Type cellulaire pulmonaire exprimant
ABCA1	Macrophages alvéolaires, cellules musculaires lisses des voies respiratoires, AEC1 et AEC2
ABCG1	Macrophages alvéolaires, cellules musculaires lisses des voies respiratoires, AEC2, lymphocytes T, cellules épithéliales, cellules dendritiques
ABCA3	AEC2

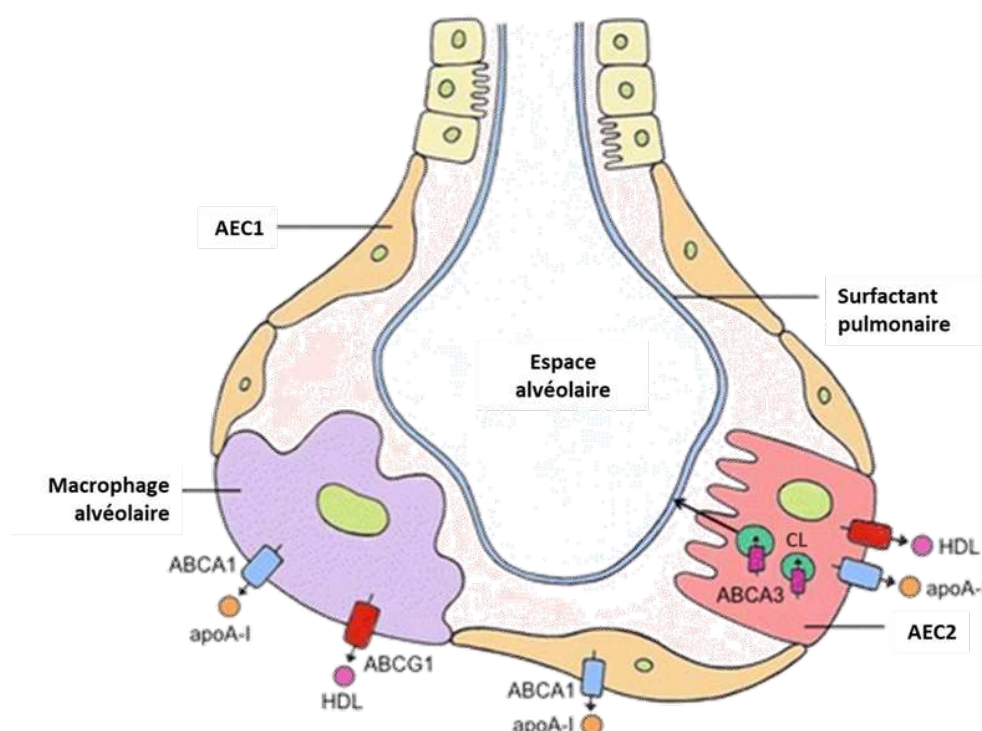


Figure 32 : Expression des transporteurs ABC dans les cellules alvéolaires (adapté de Chai et al., 2017).

Une autre étude menée chez l'Homme par Yiallourous et al. a montré un lien entre le taux sérique de HDL-C chez des enfants de 11 à 12 ans et l'apparition de l'asthme à l'âge de 15 à 17 ans. Cette étude montrant que le faible taux de HDL-C chez l'enfant est associé à un risque accru d'asthme à l'adolescence témoigne du rôle potentiel des lipoprotéines dans la pathogenèse de l'asthme (Yiallourous et al., 2012).

Dans la fibrose pulmonaire, le rôle protecteur de l'ApoA-I a également été mis en évidence. Ainsi, dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par l'administration intratrachéale de silice cristallisée chez des souris transgéniques exprimant l'ApoA-I humaine, une surexpression de l'ApoA-I à 7 et 15 jours après administration de la silice a été mise en évidence au sein des cellules épithéliales alvéolaires,

associée à une diminution significative de cellules inflammatoires ainsi que du nombre de cellules apoptotiques (E. hee Lee et al., 2013).

Aujourd'hui, il est donc de plus en plus reconnu que les HDL et l'ApoA-I présentent des effets modulateurs dans le développement pulmonaire, l'homéostasie des lipides pulmonaires et les complications associées aux maladies touchant le poumon (asthme, MPOC, cancer) (E. M. Gordon et al., 2016).

3. Pathologies pulmonaires et inflammation

Les pathologies pulmonaires, comme l'asthme, la MPOC, et d'autres pathologies, partagent de nombreuses caractéristiques, notamment l'obstruction des voies respiratoires, l'inflammation persistante des voies respiratoires et la présence de multiples médiateurs inflammatoires (Chai et al., 2017). Cependant, selon les différents facteurs induisant l'inflammation et selon les différentes pathologies pulmonaires, les réponses inflammatoires qui se mettent en place sont différentes (Aghasafari et al., 2019).

Dans le poumon, l'inflammation est généralement causée par des agents pathogènes ou l'exposition à des toxines, des polluants, des irritants ou des allergènes. Elle est initiée par la reconnaissance des agents pathogènes par des récepteurs qui vont médier l'activation de cellules inflammatoires et la production de facteurs de croissance, de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires. De cette activation résulte l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires. Ces cellules activées vont ensuite phagocyter les agents pathogènes au niveau des régions lésées et induire ensuite la réparation des cellules épithéliales endommagées (Moldoveanu et al., 2008; I.-T. Lee & Yang, 2013; Aghasafari et al., 2019).

❖ Cas particulier de la thérapie HDL dans l'emphysème pulmonaire

Parmi les pathologies respiratoires les plus fréquentes, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), qui a entraîné 3,23 millions de décès en 2019, représente aujourd'hui la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde. La BPCO est une maladie très répandue pour laquelle il n'existe aucune thérapie efficace permettant d'améliorer l'évolution de la maladie. La BPCO est une maladie pulmonaire qui réduit le flux d'air et cause des dommages respiratoires en raison de la présence d'un emphysème pulmonaire (C. Kim et al., 2016; Hayek et al., 2021).

L'emphysème pulmonaire est une pathologie caractérisée par une inflammation chronique, un stress oxydant et une protéolyse qui induit la destruction des parois alvéolaires entraînant un élargissement

de l'espace aérien (C. Kim et al., 2016). L'emprisonnement de l'air dans les alvéoles endommagées entraîne une réduction des échanges gazeux et donc une réduction de la quantité d'oxygène dans l'organisme (Hayek et al., 2021). La principale cause de l'emphysème pulmonaire est l'exposition chronique aux composants toxiques de la fumée de cigarette induite par tabagisme ou tabagisme passif comme cela a pu être observé dans une étude chez des souris témoins exposées de manière chronique à la fumée de cigarette. Cette étude a également pu montrer que des souris transgéniques surexprimant l'ApoA-I au niveau de l'épithélium alvéolaire et exposées à la fumée de cigarette n'ont pas présenté d'inflammation excessive au niveau pulmonaire ni développé d'emphysème (C. Kim et al., 2016).

L'emphysème pulmonaire se manifeste également chez des patients atteints d'une maladie génétique rare caractérisée par un déficit en AAT. Ce déficit induit non seulement un déséquilibre protéase-antiprotéase, avec pour conséquence une inflammation accrue, mais aussi des lésions protéolytiques du tissu pulmonaire (Fear et al., 2007; Stoller & Aboussouan, 2012). L'inflammation aiguë induit la sécrétion de protéases par les neutrophiles, dont l'élastase, la collagénase et la cathepsine G, qui vont perpétuer l'inflammation, provoquer des dommages des tissus, dont la destruction alvéolaire, et, par la suite, entraîner l'altération de la fonction respiratoire (Fear et al., 2007).

Aujourd'hui, le traitement standard du déficit en AAT consiste en des injections intraveineuses hebdomadaires de doses d'AAT au-delà de la valeur seuil. Cette thérapie d'augmentation du niveau d'AAT est coûteuse mais reste la plus sûre car elle permet de ralentir efficacement la progression de l'emphysème pulmonaire (Stoller & Aboussouan, 2012; Stoller et al., 2023).

De nouvelles thérapies prometteuses sont en cours de développement comme l'administration par voie intraveineuse de HDL enrichies en AAT qui protégerait plus contre le développement de l'emphysème pulmonaire en comparaison avec de l'AAT ou des HDL seules (Moreno et al., 2014).

Les études précédemment décrites illustrent bien l'intérêt thérapeutique des HDL seules ou enrichies en AAT dans le traitement de l'emphysème pulmonaire.

III. Production et caractérisation des rHDL

1. Les méthodes de production des rHDL

Les multiples effets bénéfiques des HDL décrits précédemment font de ces lipoprotéines des nano-vecteurs d'intérêt dans le développement de nouvelles thérapies (Uribe et al., 2021). La méthode classique pour obtenir des HDL repose sur leur purification à partir de plasma par ultracentrifugation.

Cette méthode est basée sur une séparation des particules selon un gradient de densité. Bien que cette technique permette une séparation fine des différentes lipoprotéines, elle ne convient pas à la purification de grandes quantités de HDL qui nécessite de grandes quantités de plasma pour de faibles rendements d'ApoA-I ou de HDL, avec d'autres contraintes liées à la pasteurisation visant à prévenir les risques de transmission de maladies (Ma et al., 2018). Cette méthode est donc coûteuse en termes de temps et de quantité de plasma à utiliser et n'apparaît pas adaptée pour la production de HDL à grande échelle (Kuai et al., 2016; Uribe et al., 2021).

L'utilisation des HDL plasmatiques présentant certaines limites, des recherches menées sur le développement des rHDL ont été développées en raison de l'essor de la nano-médecine de précision. Les avantages potentiels de ces rHDL sont très variés, y compris l'utilisation potentielle en tant que vecteurs naturels de délivrance de médicaments ou d'agents de contraste pour l'imagerie médicale.

Ces nanoparticules mimétiques des lipoprotéines sont constituées de deux éléments principaux : des protéines (ou des peptides) et des lipides, et peuvent être synthétisées soit sous une forme discoïdale constituée de bicouches lipidiques, soit sous une forme sphérique constituée d'une monocouche lipidique, toutes deux étant stabilisées par des molécules d'ApoA-I. Ces nanoparticules HDL recombinantes peuvent être préparées selon différentes méthodologies (Z. Zhang et al., 2010).

a. Méthode par sonication

La méthode par sonication a été la première utilisée avec, par la suite, des modifications par rapport au protocole original. Le principe de cette méthode est basé sur l'action d'ultrasons sur le support lipidique pour induire la formation de petites vésicules unilamellaires et faciliter ainsi l'incorporation d'ApoA-I et la formation des nanoparticules. Des particules de forme sphérique peuvent être préparées par la méthode de sonication (Pittman et al., 1987). Les rHDL obtenues par cette méthode ont une taille, une forme et des propriétés similaires à celles de HDL endogènes (Zhang et al., 2010).

b. Méthode de dialyse du cholate de sodium

Cette méthode a été développée par Matz et Jonas dans les années 1980 et est l'une des techniques les plus utilisées (Matz & Jonas, 1982). Cette technique vise à générer des perturbations membranaires en ajoutant du cholate de sodium comme détergent non dénaturant pour faciliter le repliement de l'ApoA-I et son insertion dans la bicouche lipidique, afin de conduire à la génération de particules de rHDL. Cette méthodologie est très efficace et polyvalente pour la synthèse de rHDL. En effet, des nanoparticules de différentes tailles et différentes formes peuvent être obtenues en modifiant la

composition lipidique initiale et/ou le rapport molaire ApoA-I:lipide. Cette méthode a été utilisée pour former les SRC-rHDL ainsi que les rHDL CSL-111 et CSL-112 (Uribe et al., 2021).

c. Technique de la microfluidique

La microfluidique est une technologie qui permet d'étudier des systèmes qui traitent ou manipulent de faibles volumes de fluides (allant de 10^{-9} à 10^{-18} L) par l'utilisation de canaux micrométriques présentant des dimensions de l'ordre de 10 à 100 μm (Tarn & Pamme, 2014). Cette technologie est de plus en plus utilisée grâce à son application dans divers domaines tels que la chimie, la biologie, la physique ou encore la médecine. La technologie de la microfluidique permet de développer « un dispositif de laboratoire » sur une petite puce qu'on appelle les "lab-on-chip" (LOC, laboratoire sur puce) (Figure 33 A). Ces LOC sont des microsystèmes capables d'intégrer un laboratoire entier dans une seule puce grâce à la présence de canaux microfluidiques ainsi que de composants actifs et passifs (Stroock, 2008; Bragheri et al., 2020). Cette technologie a été utilisée pour le transport de molécules cibles ou encore pour la fabrication de nombreuses puces dans différents domaines (culture cellulaire, cancérologie...) (Berthier, 2013; Xiao et al., 2013; Gopinath et al., 2019). Depuis peu, les approches basées sur la microfluidique ont été reconnues comme étant des méthodes de production efficaces, simples, reproductibles et homogènes (Peng & Chiu, 2015). De plus, cette technique permet de réduire considérablement la quantité de réactifs utilisés, avec un impact positif sur l'environnement, en permettant d'avoir un haut niveau d'automatisation dans les mesures (Bragheri et al., 2020).

Le principe de la microfluidique s'appuie sur la circulation de micro-flux de fluide dans des microcanaux confinés (Berthier, 2013). Le flux dans les dispositifs microfluidiques est la plupart du temps laminaire, en opposition au flux turbulent qui ne permet pas d'obtenir une bonne homogénéité. Le mélange entre deux composés se fait par diffusion moléculaire. La circulation des fluides par flux laminaire permet également la formation de microgouttelettes dont la quantité atteint 100 à 1000 gouttes par seconde (Figure 33 B). Elles sont ainsi produites de manière très reproductibles. Des réactifs peuvent également être introduits dans les gouttelettes et le mélange se fait en quelques millisecondes (Tarn & Pamme, 2014).

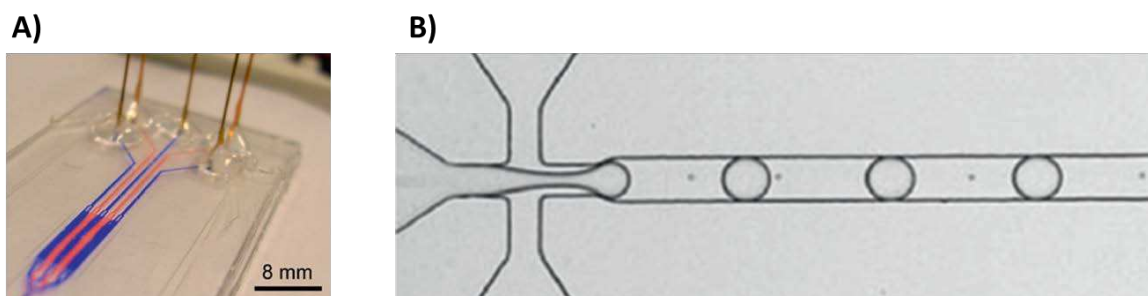


Figure 33 : A) Flux laminaire de deux substances colorées au sein d'une puce microfluidique. B) Production de microgouttelettes (issue de Tarn & Pamme, 2014).

L'une des applications utilisées en microfluidique est la formation de nanoparticules en une seule et unique étape, dans laquelle des méthodes de diffusion, d'émulsification et de mélange sont utilisées (Y. Kim et al., 2013). Ceci a permis de préparer de nombreux types de nanoparticules biocompatibles tels que des liposomes, des nanoparticules polymériques et des nanoparticules hybrides lipides-polymères (Y. Kim et al., 2012, 2013; Peng & Chiu, 2015).

La reconstitution des HDL par microfluidique permet d'en produire une grande quantité en utilisant un LOC généralement composé de trois canaux d'entrée débouchant sur un large canal en aval qui permet un fort mélange entre les différents composés grâce à la formation de deux micro-tourbillons (Figure 34). En ajustant les différents paramètres (vitesse de mélange, concentration des réactifs, rapport lipide/protéine), les caractéristiques physico-chimiques des rHDL pourront être contrôlées et des HDL de taille uniforme (8 à 12 nm) pourront être obtenues. Par cette méthode, 400 mg de particules HDL peuvent être produites par heure (Kornmueller et al., 2019).

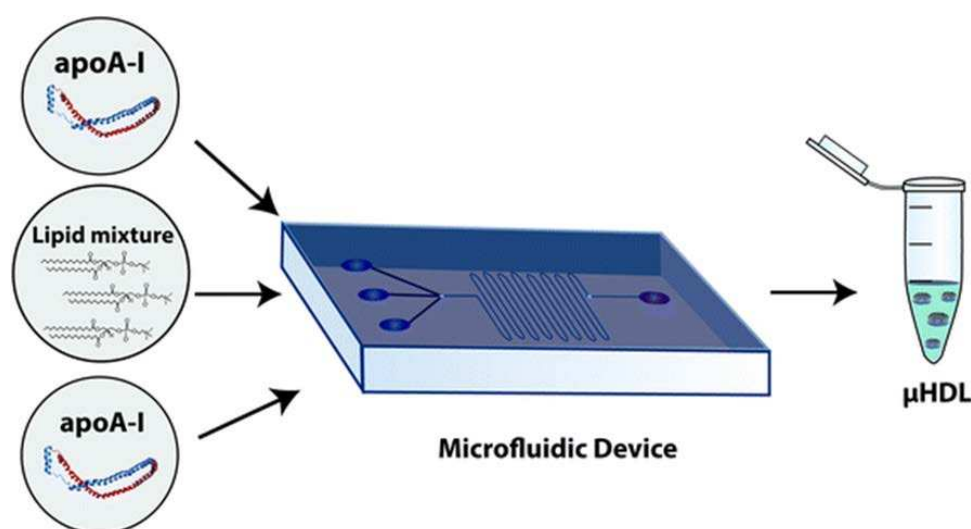


Figure 34 : Schéma de la méthode de reconstitution de rHDL par microfluidique (issue de Uribe et al., 2021).

Il existe dans la littérature de nombreuses autres méthodes de production des nanoparticules de rHDL comme l'assemblage par lyophilisation ou encore par l'urée mais celles-ci sont moins utilisées (Fukuda et al., 2020). Une fois formées, les particules de rHDL doivent être contrôlées afin notamment de déterminer leur homogénéité et être ensuite caractérisées par différentes approches méthodologiques telles que la détection optique (fluorescence ou chimioluminescence), la spectrométrie de masse, la diffusion dynamique de la lumière (DLS, "dynamic light scattering") et la résonance magnétique nucléaire (RMN) (Tarn & Pamme, 2014).

2. Les méthodes de caractérisation des rHDL

Les rHDL synthétisées doivent répondre à certains critères physicochimiques et biologiques avant une utilisation thérapeutique directe ou pour la vectorisation de médicaments. Les rHDL doivent effectivement avoir une taille, une densité et des caractéristiques de surface similaires à celles des HDL plasmatiques afin de garder une bonne stabilité dans le temps dans la circulation sanguine. Les rHDL doivent également être non toxiques, non immunogènes et biocompatibles (Kornmueller et al., 2019).

Une fois formées, les propriétés biophysiques et biochimiques des nanoparticules sont déterminées par différentes méthodes. Parmi les méthodes qui permettent comparer les nanoparticules de rHDL avec les HDL plasmatiques, les plus utilisées dans la littérature sont : la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à transmission (MET), le dichroïsme circulaire et la chromatographie d'exclusion de taille (SEC, "size-exclusion chromatography").

a. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La DLS est une méthode qui permet de déterminer la distribution et la taille de particules en suspension allant de moins de 1 nm à 500 nm. C'est la méthode la plus utilisée pour déterminer la taille des nanoparticules de rHDL (Schwendeman et al., 2015; Didichenko Svetlana A. et al., 2016; Del Giudice et al., 2017; Fukuda et al., 2020; Jebari-Benslaiman et al., 2020).

Le principe de cette technique repose sur le phénomène de diffusion de Rayleigh, dans lequel les particules qui diffusent la lumière sont plus petites que la longueur d'onde du faisceau lumineux. La DLS mesure le mouvement brownien des particules qui correspond au mouvement aléatoire des particules dans un fluide résultant de leur collision avec les molécules présentes dans le solvant. Ces informations permettent de déterminer la taille hydrodynamique des particules. En effet, les particules de petites tailles se déplacent plus rapidement que les grosses particules. Un faisceau laser va éclairer des particules qui vont diffuser une partie de cette lumière dont l'intensité va fluctuer dans le temps

en fonction des mouvements browniens des particules diffusantes. L'intensité de cette fluctuation est ensuite analysée afin de calculer la taille des particules (Figure 35).

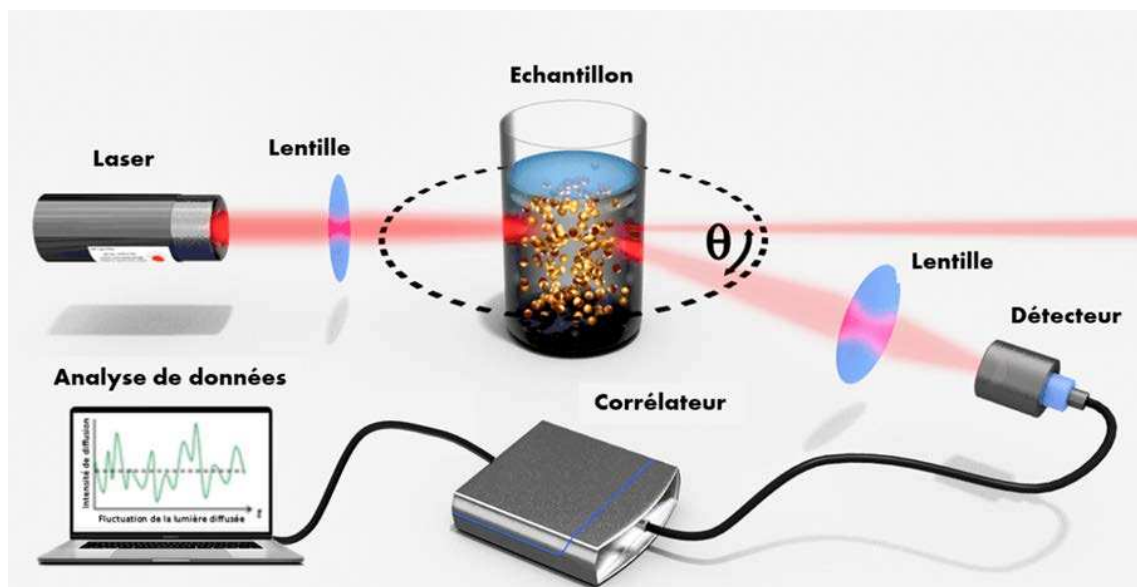


Figure 35 : Représentation schématique du principe de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (modifiée à partir de LS Instruments).

En plus de la taille des particules, la DLS donne une bonne indication de l'homogénéité d'une solution ou de la formation d'agrégats. Toutefois, cette technique présente plusieurs limitations. En particulier, les mesures ne sont fiables que si l'indice de polydispersité (qui caractérise l'hétérogénéité de taille d'un polymère) est faible. D'autre part, le signal obtenu en DLS dépend fortement de la taille des particules et les particules de grande taille contribuent beaucoup plus fortement au signal que les petites. En conséquence, la présence de contaminants de grande taille (poussières, agrégats de grande taille...), même en faible quantité, perturbe fortement le signal et rend son interprétation délicate voire impossible. La DLS est donc une méthode permettant de donner une indication sur la taille des nanoparticules, mais il est souvent nécessaire de confirmer ces tailles par le biais d'autres méthodes telles que la MET ou la chromatographie d'exclusion stérique.

b. Microscopie électronique à transmission (MET)

De nombreuses études déterminent la taille et la morphologie des nanoparticules rHDL en utilisant la microscopie électronique à transmission (MET) (Y. Kim et al., 2013; Schwendeman et al., 2015; J. Huang et al., 2020). La microscopie électronique est une méthode de microscopie utilisant un faisceau d'électrons à la place de la lumière visible pour illuminer les échantillons, ce qui permet d'avoir un pouvoir de résolution plus élevé en raison de la très faible longueur d'onde des électrons (de l'ordre de 10^{-12} m). Cette technique permet donc de produire des images à haute résolution avec des grossissements allant de 10^3 à 10^6 (Rijal, 2020; Tankeshwar, 2018). Il existe plusieurs types de

microscopie électronique : La microscopie électronique à transmission (MET) ou à balayage (MEB). Dans la MEB, le faisceau électronique balaye la surface de l'échantillon tandis qu'avec la MET les électrons le traversent. Le principe de cette technique repose sur l'interaction des électrons avec l'échantillon analysé et la détection des électrons traversant ou réfléchis. Un filament de tungstène chauffé permet de générer le faisceau électronique et une lentille électromagnétique assure la focalisation du flux d'électrons en un faisceau mince directement sur l'échantillon. Le rayonnement électronique émis à travers la lentille objectif par l'échantillon est transcrit en image visualisable sur un écran (Figure 36) (Rijal, 2020; Tankeshwar, 2018).

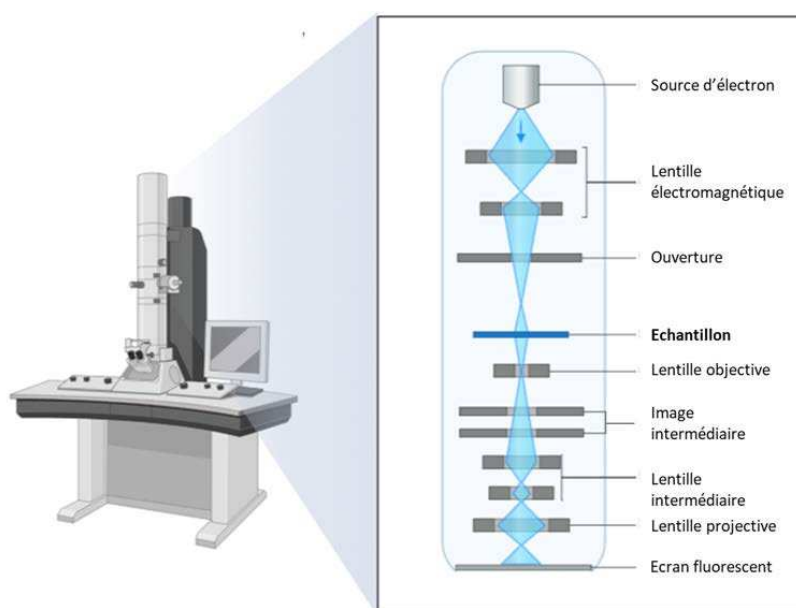


Figure 36 : Représentation schématique du fonctionnement de la microscopie électronique à transmission (Biorender).

c. Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La chromatographie d'exclusion de taille ou gel filtration fait également partie des méthodes utilisées pour caractériser les nanoparticules de rHDL (Fukuda et al., 2020). La SEC permet de séparer des macromolécules ou nanomolécules dans une solution hétérogène en fonction de leur volume hydrodynamique ou de leur structure.

La séparation des particules s'effectue à travers une colonne remplie d'une résine poreuse formée par des petites billes sphériques. Lorsque l'échantillon est introduit dans la colonne, les plus petites molécules vont passer par les pores et vont être davantage ralenties tandis que les plus grosses, incapables de pénétrer dans les pores, vont progresser plus rapidement dans la colonne en passant entre les billes (Figure 37). Ceci se traduit par un temps de rétention plus court pour les grosses molécules, éluées plus rapidement par rapport aux petites molécules.

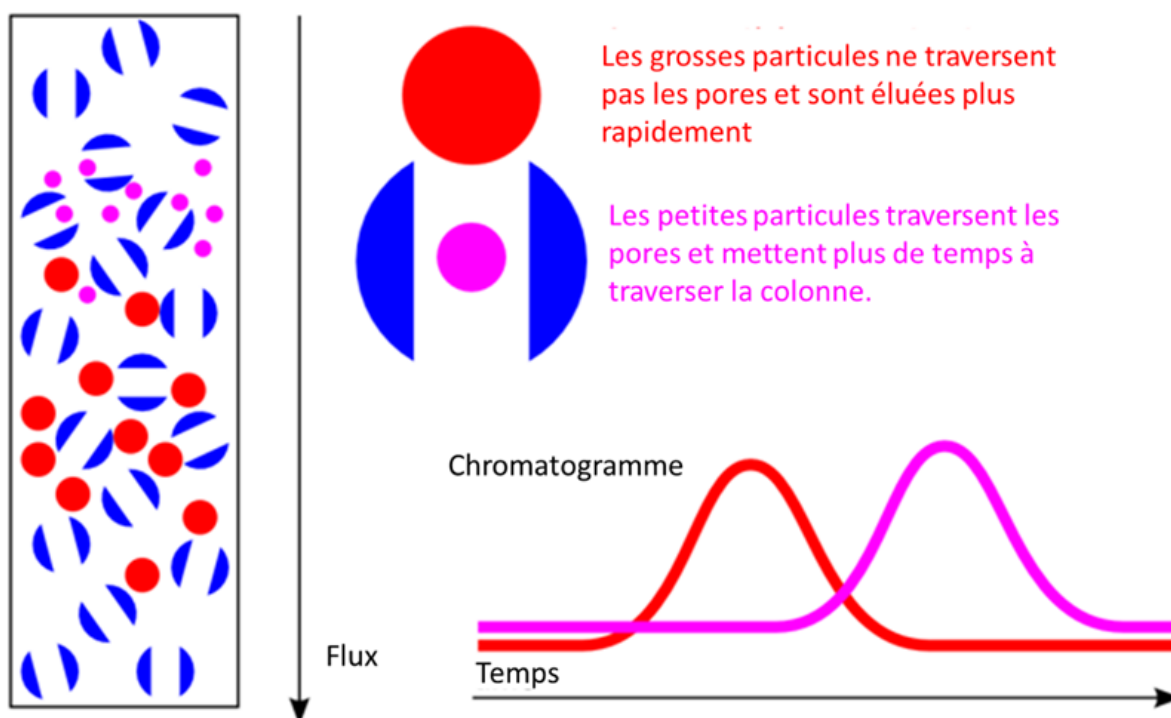


Figure 37 : Représentation schématique du principe de la chromatographie d'exclusion de taille (traduit de *Size Exclusion Chromatography (SEC) Service*).

Pour cette méthode, le choix de la colonne d'exclusion est à déterminer en fonction de son domaine de fractionnement qui définit la plage de poids moléculaires pouvant être séparée avec une bonne résolution. Par cette méthode, des molécules de même taille ou de taille voisine ne peuvent pas être séparées.

d. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (CD, "circular dichroism") est une autre méthode de caractérisation souvent utilisée pour l'analyse des nanoparticules (P. G. Lerch et al., 1996; Del Giudice et al., 2017; Jebari-Benslaiman et al., 2020). Le principe de cette technique repose sur la capacité d'un échantillon placé dans un environnement asymétrique à absorber différemment la lumière polarisée circulairement à droite ou à gauche (Figure 38). Le spectre de dichroïsme obtenu est donc basé sur la différence d'absorbance entre ces deux lumières polarisées et cela pour chaque longueur d'onde du faisceau de lumière émis. La CD est une méthode de spectroscopie qui permet d'obtenir des informations sur la structure des protéines et des acides nucléiques.

Dans le cas d'une protéine, l'absorbance des liaisons peptidiques se fait dans l'UV lointain c'est-à-dire de 180 à 260 nm, tandis que l'absorbance des acides aminés aromatiques se mesure dans l'UV proche entre 250 et 330 nm. Le CD permet d'avoir des informations sur la structure secondaire (UV-lointain) ou tertiaire (UV-proche) de la protéine ainsi que sur l'effet de l'environnement (pH, température...) ou

de mutation sur la conformation. Cette méthode peut être appliquée sur de très petites quantités de protéine (quelques μg) et n'est pas une technique destructrice dans la mesure où l'échantillon peut être réutilisé après analyse.

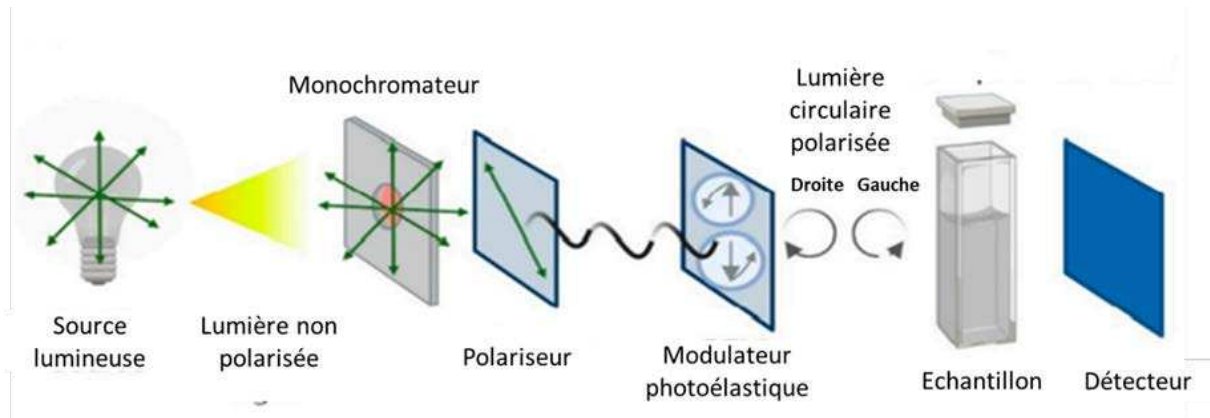


Figure 38 : Représentation schématique du principe du dichroïsme circulaire (traduit de *Circular Dichroism (CD)*).

Pour la caractérisation des HDL reconstituées, le CD est classiquement utilisé pour analyser la conformation d'ApoA-I en déterminant le pourcentage d'hélice- α par l'analyse du spectre de CD dans l'UV lointain. Les auteurs caractérisent ainsi la conformation d'ApoA-I isolée ou intégrée dans les rHDL, ou encore l'influence des mutants d'ApoA-I précédemment décrits sur sa conformation (Figure 39) (Ikou et al., 2017; Saito et al., 2003).

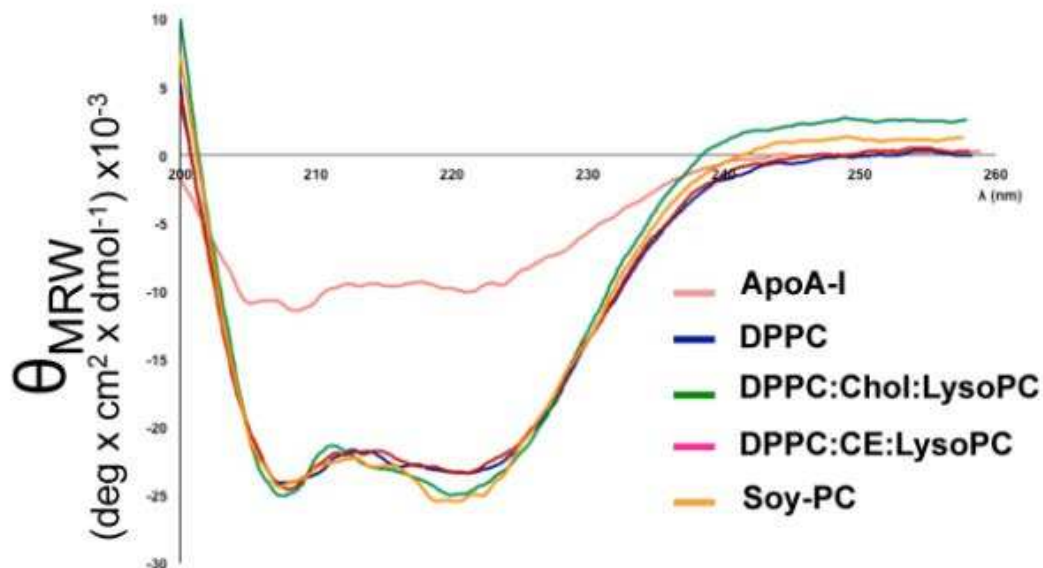


Figure 39 : DC de l'ApoA-I en solution et de différentes préparations de rHDL obtenus à partir d'ApoA-I en présence de différents phospholipides. θ_{MRW} : ellipticité molaire moyenne par résidu (Jebari-Benslaiman et al., 2020).

La caractérisation de la conformation et de la taille des nanoparticules rHDL est un pré requis avant toute utilisation dans le cadre d'une action thérapeutique. Il est également important de vérifier que ces particules n'induisent pas de cytotoxicité, qu'elles soient biocompatibles et qu'elles possèdent bien les propriétés requises pour leur action thérapeutique, en particulier les propriétés anti-inflammatoires dans le cadre de notre étude. Pour cela, il existe de nombreuses méthodologies que nous avons choisi de détailler plutôt dans la partie expérimentale des résultats (Partie I).

Objectif de la thèse

Les lipoprotéines sont des acteurs importants dans l'homéostasie du cholestérol et plus particulièrement les HDL qui sont reconnues pour être un facteur protecteur important des événements cardiovasculaires. Il est en effet clairement établi que des faibles taux de HDL-C peuvent être associés à un plus grand risque de développer des complications vasculaires. Cet effet protecteur des HDL est largement attribuable à son rôle clé dans le transport inverse du cholestérol et également à ses propriétés pléiotropiques en particulier anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-thrombotiques qui sont attribuées à sa principale protéine, l'ApoA-I. Les HDL présentent également des fonctions de transport au sein de notre organisme de nombreuses molécules endogènes comme les vitamines, des hormones et certaines protéines telles que l'AAT, une protéine de la phase aiguë inhibiteur de l'élastase. Ces différentes propriétés font des HDL des nanoparticules de premier choix pour leur utilisation et pour la vectorisation à visées thérapeutiques.

Ces développements thérapeutiques nécessitent de disposer de HDL pures et en quantités importantes dont la méthode classique par purification à partir du plasma présente des inconvénients majeurs.

Par conséquent, l'objectif de ce travail de thèse a été de développer et produire des HDL reconstituées à partir d'ApoA-I recombinante, pour ensuite les enrichir en AAT et déterminer si celles-ci présentent les mêmes propriétés protectrices et de transport que les HDL physiologiques, afin de pouvoir envisager de les utiliser par la suite comme vecteur thérapeutique.

De mon objectif principal découlent cinq grandes étapes qui consistent en : 1) l'induction de la surexpression d'ApoA-I recombinante au sein de la bactérie *Clear coli* par la méthode de transformation bactérienne à l'aide d'un plasmide d'intérêt ; 2) la production des nanoparticules de rHDL effectuée à partir de l'ApoA-I recombinante ; 3) la vérification des propriétés structurales et fonctionnelles des rHDL ; 4) la vérification de la biodisponibilité *in vivo* des rHDL chez des souris C57Bl/6 ; 5) l'enrichissement des rHDL avec de l'AAT, suivi d'une caractérisation structurale et fonctionnelle des nanoparticules enrichies.

Ces cinq objectifs ont été regroupés dans deux grandes parties de résultats : les résultats répondant aux quatre premiers objectifs, sont présentés dans la première partie tandis que les résultats du cinquième objectif sont détaillés dans la seconde partie.



Résultats expérimentaux

Partie I : Production, caractérisation et aérosolisation *in vivo* des nanoparticules de rHDL à partir d'ApoA-I recombinante

I. Introduction

Dans la partie bibliographique, nous avons détaillé la corrélation que l'on peut établir entre les taux plasmatiques de HDL et le développement des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques ainsi que de certaines pathologies pulmonaires. Les multiples effets protecteurs des HDL dans certaines pathologies comme les maladies coronariennes sont dus en grande partie aux propriétés intrinsèques de l'apolipoprotéine A-I. En effet, dans les HDL, l'ApoA-I joue un rôle structurel et fonctionnel important ainsi qu'une fonction métabolique via son implication dans l'efflux du cholestérol. Certaines fonctionnalités et propriétés des HDL dépendent fortement de la conformation de l'ApoA-I, notamment du réarrangement du HDL dans le transport inverse du cholestérol (Han et al., 2005). De plus, l'ApoA-I présente de nombreux variants qui peuvent améliorer les fonctions et propriétés de celle-ci.

Toutes ces propriétés protectrices font des HDL une cible thérapeutique pertinente pour le traitement de différentes pathologies comme les maladies cardiovasculaires et inflammatoires pulmonaires mais surtout un outil de vectorisation de choix. Afin d'obtenir des HDL, la méthode la plus utilisée est la purification par ultracentrifugation à partir de plasma. Cependant, les nombreux inconvénients de cette méthode abordés dans la partie précédente nous ont poussé à plutôt les obtenir par reconstitution à partir d'ApoA-I recombinante et de phospholipide.

Les objectifs principaux de cette première partie sont donc la mise au point de la production de l'ApoA-I recombinante en grande quantité et dans un deuxième temps la mise en place de la reconstitution de rHDL à partir de cette ApoA-I recombinante. La finalité est de pouvoir obtenir des nanoparticules ayant des similarités structurales et de les utiliser *in vivo* dans une nouvelle voie d'administration comme l'inhalation.

Pour répondre à ces objectifs, nous avons produit l'ApoA-I sauvage ainsi que certains de ses variants par la surexpression chez la bactérie *Clear coli* suivi par des étapes de purification et en particulier celle du clivage de l'étiquette histidine de la protéine recombinantes par la protéase TEV ("Tobacco Etch Virus"), produite elle-même au sein du laboratoire. Cette étape de clivage ainsi les étapes de purification par chromatographie ont nécessité l'optimisation des méthodes digestion et de séparation. Les protéines recombinantes obtenues ont été caractérisées par différentes méthodes telles que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE, "sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), la spectrométrie de masse et la spectrométrie RMN. La

production des nanoparticules rHDL à partir de l'ApoA-I recombinante a également donné lieu à l'optimisation des conditions de reconstitution avec les phospholipides. Les nanoparticules ont été par la suite caractérisées par DLS, microscope électronique et RMN pour vérifier l'intégrité structurale et également sur des modèles de cellules endothéliales EA.hy926 et épithéliales A549 pour leurs propriétés biologiques.

II. Matériels et méthodes

Les travaux de cette partie se déclinent en trois grandes parties : 1) Synthèse de l'ApoA-I recombinante ; 2) Reconstitution des nanoparticules d'ApoA-I ; 3) Caractérisation et biodisponibilité des nanoparticules.

A. Synthèse de l'ApoA-I recombinante

1. Introduction

Pour cette étape, un plasmide pET28a comprenant la séquence codante pour l'ApoA-I humaine mature a été conçu par Gene Cust France (Figure 40). La séquence d'acide nucléique a été optimisée pour une surexpression optimale chez la bactérie *E. coli*. Une courte séquence codante (ENLYFQG) correspondant au site de clivage à la TEV a été ajoutée en amont de la séquence de l'ApoA-I afin de permettre le clivage de la séquence N-terminale codée par le vecteur pET28a et correspondant à l'étiquette 6 His ainsi qu'à un site de clivage par la thrombine.

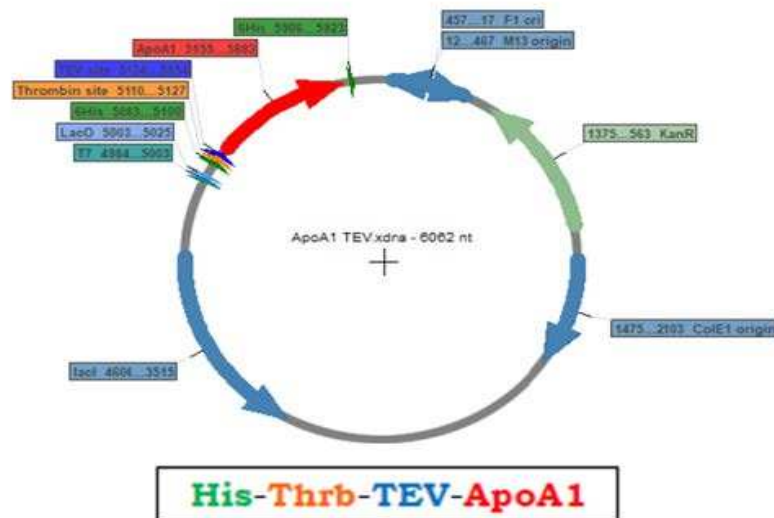


Figure 40 : Schéma du plasmide pET28a à codons optimisés conçu par GeneCust pour la transformation bactérienne et la surexpression de l'ApoA-I recombinante.

Ce plasmide est utilisé pour transformer des bactéries pour la production en très grande quantité de la protéine en plusieurs étapes (Figure 41) : ① Transformation des bactéries *Clear coli* avec le plasmide ; ② Sélection des bactéries transformées ; ③ Mise en culture et production en grande quantité des bactéries transformées ; ④ Induction de la surexpression de la protéine recombinante par l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ; ⑤ Extraction de la protéine et caractérisation ; ⑥ Clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV et purification ; ⑦ Caractérisation de l'ApoA-I recombinante avant utilisation pour la reconstitution des nanoparticules de rHDL par la co-incubation de la protéine recombinante avec les phospholipides.

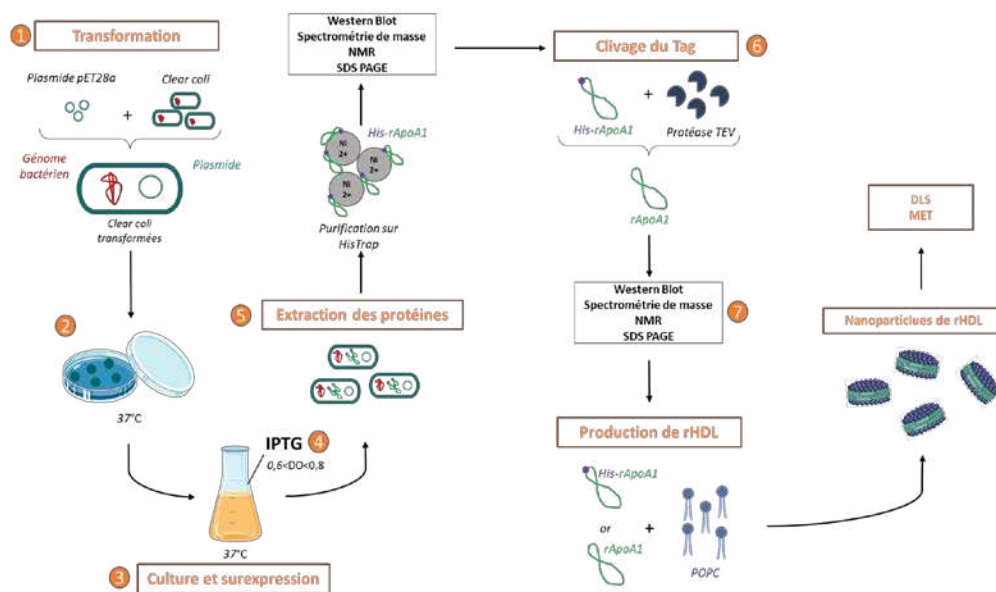


Figure 41 : Les différentes étapes de la production de l'Apolipoprotéine A-I recombinante et de la production de nanoparticules de rHDL.

2. Matériels et méthodes

a. Préparation des bactéries compétentes

La préparation des bactéries compétentes consiste à perméabiliser la membrane bactérienne afin de faciliter l'entrée du plasmide au sein de la bactérie. Les bactéries *Clear coli* non compétentes qui ont été utilisées pour la production de l'ApoA-I possèdent des LPS génétiquement modifiés qui ne déclenchent pas de réponse endotoxique. Le choix de cette souche bactérienne est important dans la mesure où l'ApoA-I présente une affinité pour les LPS (Frank & Marcel, 2000).

Un volume de 1 mL de bactérie est mis en préculture à 37 °C pendant la nuit dans 50 mL de Luria Broth stérile (LB, milieu de culture nutritif pour les bactéries). Cette préculture est ensuite diluée dans 250 mL de milieu LB (afin d'obtenir une DO_{600nm} de 0,2) et incubée à 37 °C sous agitation à 200 rpm pendant

environ 1 heure jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,55. Après refroidissement (10 minutes) dans de la glace, la suspension bactérienne est centrifugée pendant 10 minutes à 23 °C à 3 900 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est séché sous hotte puis repris dans 80 mL de tampon Inoue (Green & Sambrook, 2020). Après une nouvelle étape de centrifugation (10 minutes, 23 °C, 3 900 rpm) suivie de l'élimination du surnageant, le culot est séché et remis en suspension dans 20 mL de tampon Inoue puis incubé dans de la glace pendant 3 à 4 heures. Afin de pouvoir stocker les bactéries compétentes, 1,5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO) stérile a ensuite été ajoutée.

b. Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries ont été transformées avec différents plasmides correspondant à différents variants de l'ApoA-I présentés dans la partie bibliographique : forme sauvage (ApoA-I_{WT}), R173C ou Milano (ApoA-I_M), A158E (ApoA-I_{AE}) et V156K (ApoA-I_{VK}). Pour ces transformations, 2 µL de plasmides pET28a-ApoA-I ont été mis en contact avec 50 µL de bactéries compétentes dans de la glace pendant 30 minutes. Un choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes, suivi de 2 minutes dans de la glace permet la pénétration des plasmides dans les bactéries. Ensuite, 250 µL de milieu SOC (Super Optimal Broth) préincubé à 42 °C est ajouté, puis la suspension bactérienne est incubée à 37 °C pendant 1 heure sous agitation à 200 rpm. Enfin, 100 µL de cette suspension sont étalés sur boîte de pétri contenant du milieu LB gélosé supplémenté avec 30 µg/mL de kanamycine (gène résistance codé par le plasmide qui permet la sélection des bactéries transformées contenant le plasmide d'intérêt). Les boîtes de pétri sont incubées à 37 °C pendant la nuit pour permettre le développement de colonies. Une ou plusieurs colonies sont sélectionnées et prélevées sur la boîte de pétri, puisensemencées dans 200 mL de milieu LB liquide (supplémenté avec 30 µg/mL de kanamycine). Le milieu est ensuite incubé pendant la nuit à 37 °C sous agitation à 200 rpm.

c. Surexpression de l'apolipoprotéine A-I recombinante

Dans toutes les étapes suivantes, les milieux de culture utilisés contiennent l'antibiotique de sélection (kanamycine à 30 µg/mL) afin d'éviter la croissance des bactéries contaminantes dans le milieu. La préculture bactérienne précédente de 200 mL estensemencée dans 1 litre de milieu LB liquide à une DO_{600nm} initiale de 0,4 et celle-ci est mise en culture pendant environ 1 h (37 °C, 200 rpm). Lorsque la turbidité du milieu traduisant la croissance bactérienne atteint une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,8, l'ajout d'IPTG à une concentration finale de 1 mM suivi d'une incubation à 37 °C avec une agitation de 200 rpm pendant 4 heures permet d'induire l'expression de l'ApoA-I. En effet, dans le vecteur pET28a, l'expression du gène d'intérêt est sous le contrôle de l'opéron lactose et l'IPTG, un analogue structural

non hydrolysable du lactose, permet de lever la répression de l'expression du gène APOA1. Le culot bactérien est ensuite récupéré après une centrifugation de 20 minutes (4 °C, 4 000 rpm).

d. Isolement et purification de l'apolipoprotéine A-I recombinante

Chaque culot provenant de 1 L de culture bactérienne est repris dans 10 mL de tampon de lyse (0,1 mg/mL de lysozyme dans du PBS à pH 7,4) et incubé à 4 °C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lysées par sonication (5 minutes effectives, 4 secondes ON et 10 secondes OFF, puissance 60 %). Le lysat cellulaire est centrifugé à 12 000 x g à 4 °C pour éliminer les matières insolubles et le surnageant est récupéré. Des échantillons avant (AVI), après induction (API), provenant du culot (P) ou du surnageant (S) sont récupérés pour contrôler la présence de l'ApoA-I sur gel SDS-PAGE à 12 % d'acrylamide.

L'ApoA-I recombinante est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur un système AKTA PURE 25 (GE Healthcare) en utilisant une colonne HisTrap HP de 5 mL (Figure 42). Cette méthode de purification est généralement utilisée pour la purification de protéines recombinantes possédant une étiquette histidine. Le tampon de chargement (A) et le tampon d'élution (B) ont été préparés à partir du tampon PBS à pH 7,4 contenant respectivement 20 mM et 500 mM d'Imidazole. Le surnageant est chargé sur la colonne et élué par différents paliers successifs de tampon A/B (correspondant à 25 mM, 75 mM, 100 mM et 500 mM d'imidazole) pour permettre une purification optimale de la protéine. Les fractions correspondant à la protéine purifiée sont ensuite rassemblées puis passées sur une colonne de dessalage afin de conditionner l'ApoA-I dans du PBS et d'éliminer l'imidazole susceptible d'interférer avec la TEV au cours du clivage de l'étiquette Histidine dans l'étape suivante.

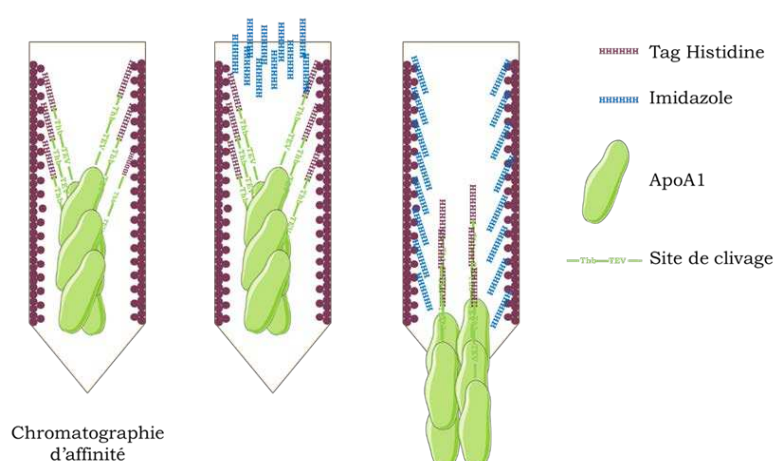


Figure 42 : Principe de la chromatographie d'affinité HisTrap pour la purification de l'ApoA-I. La colonne de chromatographie d'affinité HisTrap est composée d'une résine d'affinité sur laquelle est fixée du nickel. Le nickel va permettre la fixation des protéines portant une étiquette histidine (tube de gauche). Une fois fixées à la colonne, les protéines sont éluées par une solution d'imidazole (tube du milieu) qui est une molécule similaire à la chaîne latérale de l'histidine et qui va donc se lier par compétition à la résine (tube de droite).

e. Clivage de l'étiquette Histidine par la protéase TEV

La TEV est une protéase qui permet de cliver l'étiquette 6xHis fusionnée à l'ApoA-I recombinante dans le plasmide pET28a. Cette enzyme reconnaît très spécifiquement la séquence d'acides aminés Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-(Gly/Ser) et va effectuer le clivage entre les résidus Gln et Gly/Ser (ENLYFQ-G/S). L'utilisation de cette protéase présente de nombreux avantages. En premier lieu, cette protéase est très spécifique de son site de clivage ce qui permet d'éliminer le risque de dégradation de l'ApoA-I recombinante qui pourrait se produire en utilisant une protéase moins spécifique telle que la Thrombine. D'autre part, elle possède une activité et une stabilité optimale pendant 24 mois et son activité reste optimale dans une large gamme de tampons (de pH 6,0 à pH 9,0). Enfin, la TEV recombinante utilisée contient une étiquette poly-histidine qui permet facilement son élimination en chromatographie d'affinité avec une colonne d'affinité HisTrap. Dans notre étude, cette TEV recombinante est produite au sein de notre laboratoire.

❖ Production et purification de la protéase TEV recombinante

La TEV est produite à partir d'une souche bactérienne appelée BL21 pLysS. Les étapes de sa production sont très similaires à la production de l'ApoA-I recombinante. La souche bactérienne est préalablement transformée avec le plasmide d'intérêt pET-9a-His-TEV. Ici, les bactéries sont mises en culture dans un milieu LB supplémenté en chloramphénicol (20 µg/mL) et en kanamycine (50 µg/mL). La surexpression de la protéase est induite de la même manière que pour l'ApoA-I par ajout de 1 mM d'IPTG suivi d'une incubation à 30 °C pendant 3 heures. Après récupération des bactéries, le culot est repris dans un tampon spécifique (50 mM Tris HCl, 300 mM NaCl, 10 % glycérol, 1 mM β-mercaptoéthanol et 1 mM PMSF à pH 8,0) puis lysé par sonication. Ce tampon est utilisé dans toutes les étapes de la production. La purification de la protéase est réalisée par chromatographie d'affinité en utilisant une colonne HisTrap HP de 5 mL avec les tampons de chargement (A) et d'élution (B) contenant respectivement 10 mM et 1 M d'imidazole. La TEV purifiée est passée sur une colonne de dessalage afin de conditionner la protéine dans un autre tampon (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 10 % glycérol, et 5 mM dTT pH 8,0) et d'éliminer l'imidazole. Pour la conservation de l'enzyme, la TEV est aliquotée et mélangée à un volume équivalent de glycérol froid 80 % pour être stockée à - 80 °C.

❖ Clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV

L'ApoA-I surexprimée précédemment avec l'étiquette 6xHis est soit conservée telle quelle, soit elle subit une étape de clivage par la TEV afin d'éliminer l'étiquette selon le protocole suivant : la protéine purifiée est concentrée à 2 mg/mL par ultrafiltration sur colonne Amicon® Ultra-4 dont le seuil de

coupure est de 10 kDa. La protéase TEV est ajoutée selon un ratio massique de 1 mg pour 100 mg de protéine et l'échantillon est incubé à 30 °C pendant 10 heures. La purification de la protéine sur la colonne HisTrap selon la méthode décrite précédemment permet de séparer l'ApoA-I clivée de la forme non clivée, ainsi que d'éliminer l'étiquette 6x histidine libre et la TEV (Figure 43).

Le rendement d'obtention de la protéine clivée purifiée est déterminé par la méthode BCA (BiCinchoninic acid assay) et la caractérisation de l'intégrité structurale de la protéine par différentes méthodes telles que la RMN, la spectrométrie de masse ainsi que par Western Blot. Suite à cette caractérisation, les formes clivées (ApoA-I) ou non clivées (His-ApoA-I) de la protéine sont utilisées pour la reconstitution des nanoparticules.

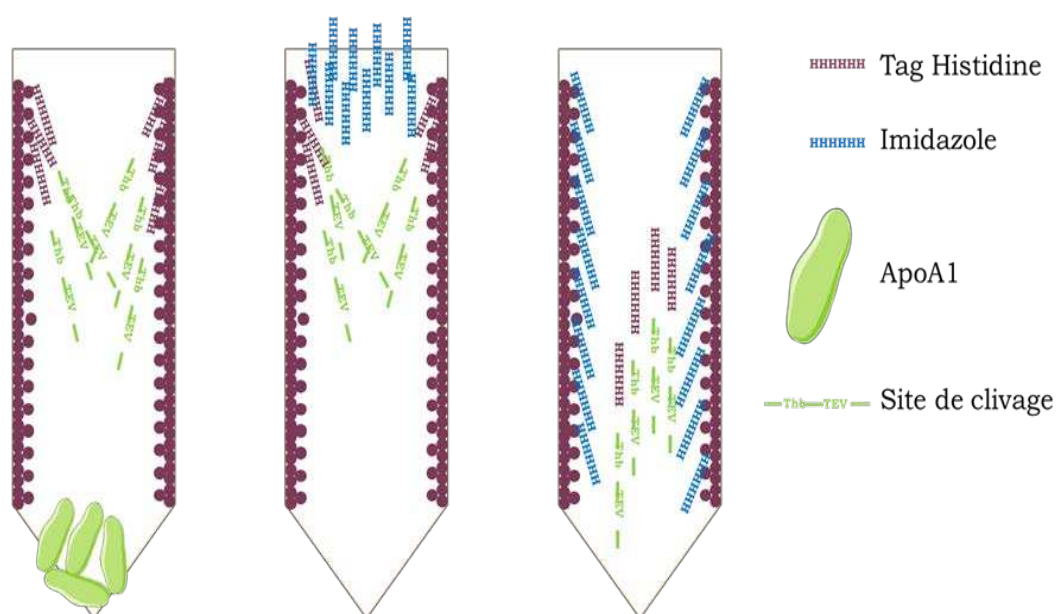


Figure 43 : : Principe de la chromatographie d'affinité HisTrap après clivage du Tag. Après le clivage de l'étiquette histidine, les protéines sont de nouveau purifiées afin d'éliminer les étiquettes ayant été clivées, les protéines non clivées et la TEV. Lorsque la solution est introduite dans la colonne, les protéines clivées n'ayant plus d'étiquettes sortent directement (tube de gauche). Cependant, le TEV et les tags clivés se lient à la colonne (tube du milieu). Un lavage de la colonne est ensuite effectué à l'aide de la solution d'imidazole (tube de droite).

B. Reconstitution des nanoparticules de rHDL

La production de nanoparticules de rHDL a été effectuée en mettant en contact la protéine recombinante avec les phospholipides en utilisant la méthode au cholate de sodium (Figure 44) (Jebari-Benslaiman et al., 2020).

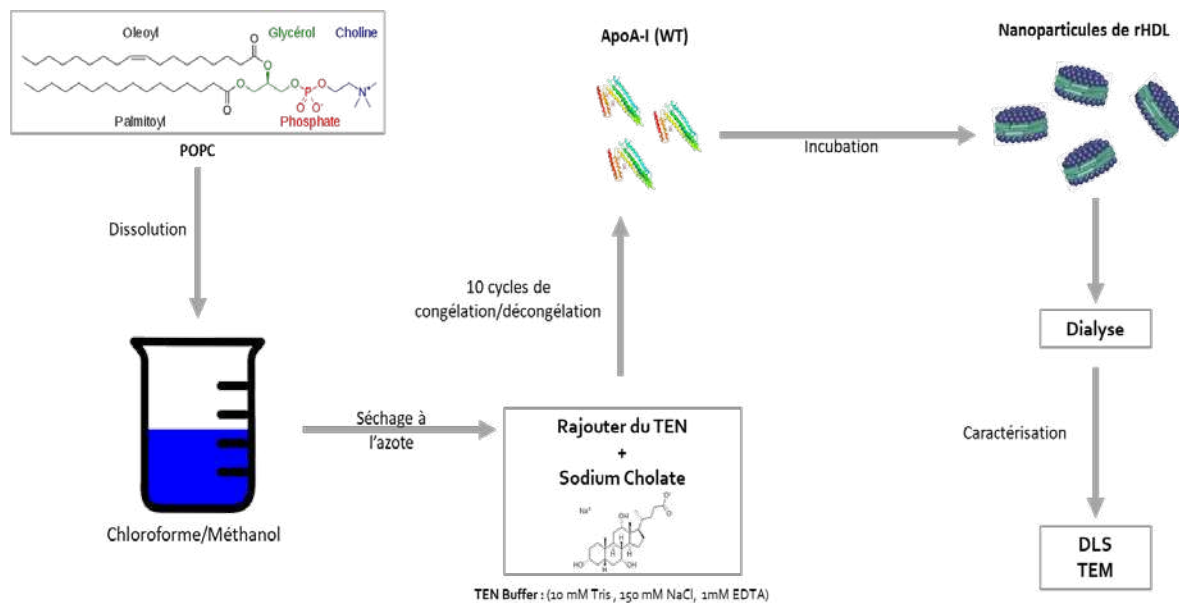


Figure 44 : Procédure de production des nanoparticules de rHDL à partir de His-rApoA-I ou rApoA-I et de phospholipides (POPC).

Afin d'obtenir des nanoparticules d'une taille de 7-8 nm correspondant à la taille des pré- β -HDL, différents ratios molaires protéines:phospholipides entre 1:75 et 1:125 ont été testés (Tableau 7). Une quantité donnée de POPC est dissous dans 0,7 mL d'un mélange de chloroforme:méthanol (2:1, v/v) puis séché sous un flux d'azote pendant environ 2 heures. Le film lipidique obtenu est repris dans du tampon TEN (10 mM Tris, 150 mM NaCl et 1 mM NaCl à pH 8,0) puis vortexé jusqu'à obtention d'une solution trouble. Le cholate de sodium est ensuite ajouté dans la solution en quantité équimolaire avec les phospholipides. Les dix cycles de congélation/décongélation réalisés ensuite successivement dans l'azote liquide et dans de l'eau à température ambiante permettent de franchir la température de transition des phospholipides et d'obtenir une solution translucide. 10 mg d'ApoA-I recombinante (forme clivée ou non) sont ajoutés, suivis d'une incubation à 37 °C pendant la nuit. Les nanoparticules de rHDL formées sont ensuite dialysées dans du tampon TEN pendant 3 jours à 4 °C afin d'éliminer tout le cholate de sodium. Les rHDL ont ensuite été centrifugées à 12 000 rpm, puis le surnageant a été récupéré et filtré avec des filtres de 0,22 μ m.

Tableau 7 : Quantités de réactifs utilisées en fonction du ratio protéine:phospholipides.

Ratio (ApoA-I:POPC)	1:50	1:75	1:100	1:125
ApoA-I	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
POPC	13,60 mg	20,52 mg	27,36 mg	34,20 mg
Cholate de Sodium	7,75 mg	11,62 mg	15,50 mg	19,38 mg

C. Caractérisation fonctionnelle et de biodisponibilité des rHDL

Une fois les nanoparticules de rHDL obtenues, leurs tailles ont été déterminées par DLS (voir article pour la méthode), ainsi que par HPLC sur une colonne de gel filtration, tandis que leur morphologie a été étudiée par MET. Les méthodologies concernant la caractérisation fonctionnelle des nanoparticules et l'étude de leur biodisponibilité seront détaillées dans la publication scientifique présentée ci-après.

III. Résultats et interprétations

A. Mise au point de la production d'ApoA-I recombinante et de la reconstitution des rHDL

1. Compétence et transformation bactérienne

Les plasmides ont été introduits dans des bactéries *Clear coli* compétentes par la méthode de transformation thermique. Les bactéries ainsi transformées possèdent alors la résistance à la kanamycine grâce à la présence du plasmide, permettant ainsi leur sélection après leur étalement sur un milieu sélectif gélosé supplémenté en kanamycine (Figure 45).

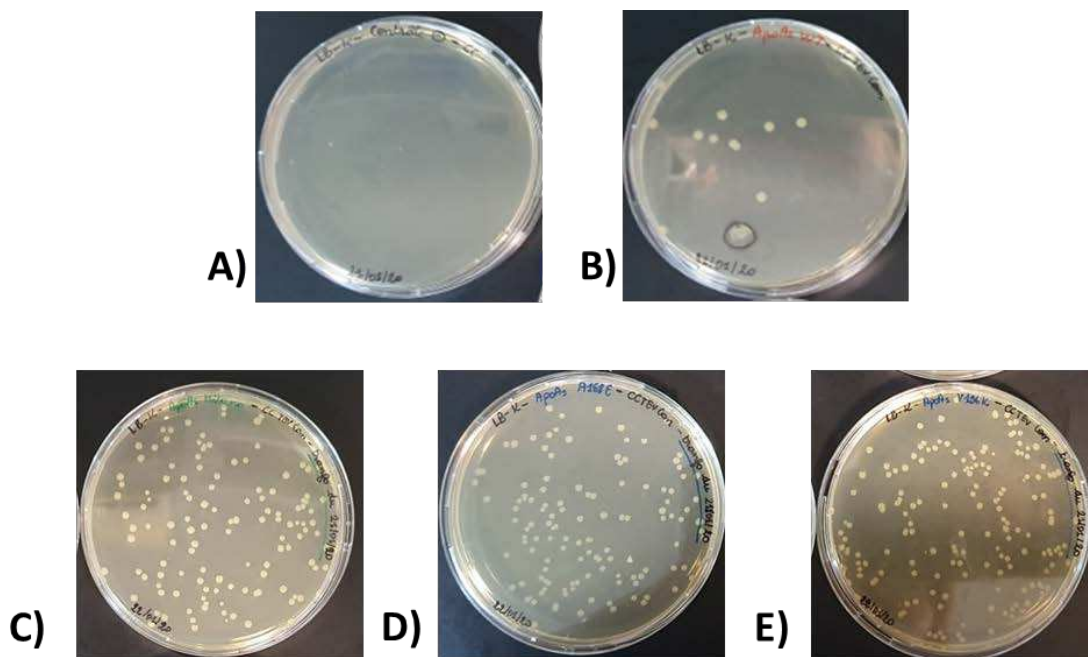


Figure 45 : Mise en culture et sélection des bactéries transformées avec les plasmides d'intérêt. A) Boîte de pétri contrôle supplémentée à la kanamycine sur laquelle des bactéries non transformées ont été mises en culture. Les bactéries transformées avec les différents mutants B) WT, C) R173C ou Milano, D) A158E et E) V156K ont été mises en culture sur des boîtes de pétri supplémentées à la kanamycine.

Les bactéries non transformées mises en culture sur ce milieu sélectif n'ont pas pu pousser car celles-ci ne possèdent pas le gène de résistance à l'antibiotique (Figure 45 A). Les bactéries ayant été transformées et ayant intégré le plasmide d'intérêt (ici pour la forme sauvage l'ApoA-I_{WT}) peuvent croître normalement dans un milieu supplémenté en kanamycine et forment ainsi des petites colonies (points blancs sur la Figure 45 B). Pour les formes mutantes de l'ApoA-I (Milano, A158E et V156K), nous observons la présence de nombreuses colonies témoignant de la bonne transformation des bactéries avec les différents plasmides (Figure 45 C-E).

2. Vérification de la surexpression de la production protéique

Suite à l'étape de surexpression pour la forme sauvage et les formes mutantes de l'ApoA-I, deux échantillons bactériens sont prélevés : celui avant induction par ajout d'IPTG (AVI) et celui après induction (API). Ces deux échantillons sont analysés sur gel SDS-PAGE 12 % afin de vérifier la bonne surexpression de l'ApoA-I (Figure 46).

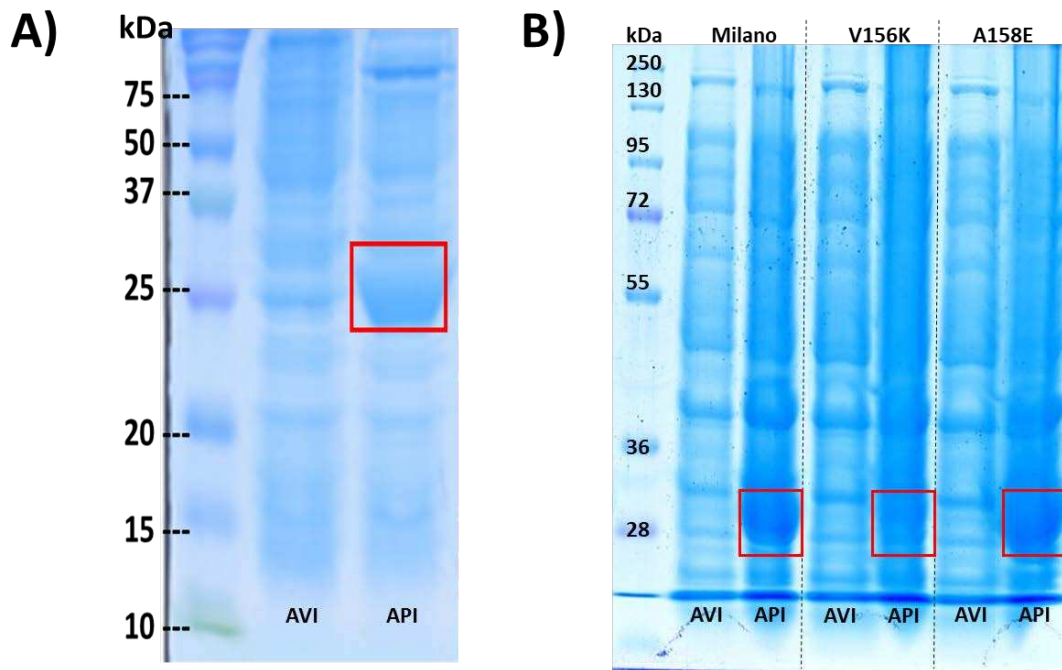


Figure 46 : Vérification sur gel SDS PAGE 12 % de la surexpression protéique de la forme sauvage (A) et mutants (B) de l'ApoA-I. Les échantillons avant induction (AVI) et après induction (API) ont été prélevés puis les bactéries ont été lysées afin d'analyser le surnageant sur gel SDS-PAGE. Les encadrés en rouge correspondent à la protéine surexprimée après induction à l'IPTG à une masse molaire voisine de 28 kDa.

La présence d'une bande intense (encadré rouge) entre 28 kDa et 36 kDa uniquement pour tous les extraits bactériens ayant subi l'induction (API) suggère que la surexpression de la forme sauvage (Figure 46 A) et des protéines mutantes (Figure 46 B) a été induite avec succès. Les différents variants de l'ApoA-I sont exprimés de façon abondante et soluble dans la mesure où elles se retrouvent ensuite dans le surnageant de lyse.

3. Purification de l'ApoA-I recombinante par chromatographie d'affinité : optimisation de la méthode d'élution

Les surnageants de lyse bactériens sont ensuite purifiés sur colonne d'affinité HisTrap en utilisant deux méthodes différentes d'élution par les tampons contenant l'imidazole afin de déterminer les meilleures conditions de purification. La première méthode repose sur une augmentation progressive de la concentration en imidazole (élution par gradient continu) (Figure 47 A), tandis que dans la deuxième méthode, la composition de la phase est modifiée par paliers de quatre concentrations différentes en imidazole (élution par gradient par palier) (Figure 47 C).

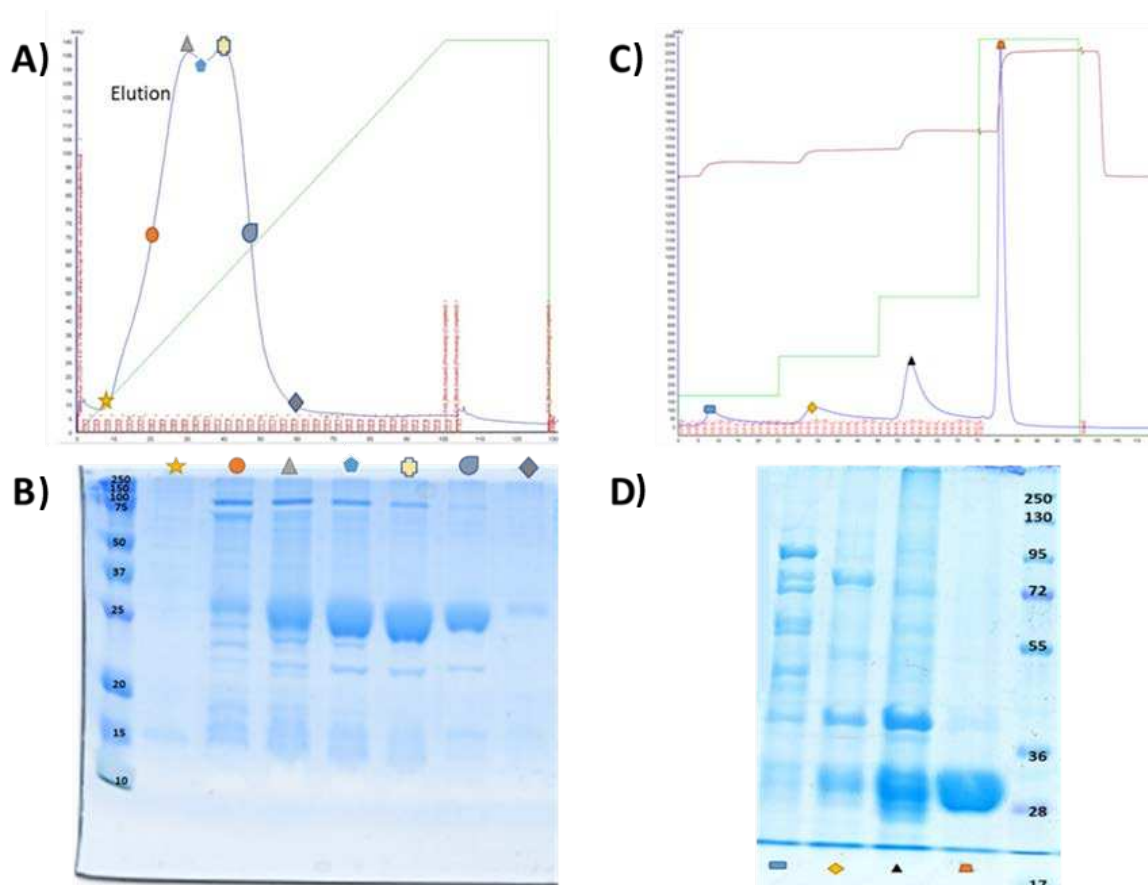


Figure 47 : Purification de l'ApoA-IWT recombinante par chromatographie d'affinité en utilisant deux méthodes d'élution. A) Purification de rApoA-I par gradient continu en imidazole. La courbe bleue correspond à la DO à 280 nm et la courbe verte au gradient d'imidazole. B) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie de différentes fractions de purification. Colonne de gauche : marqueur de poids moléculaire, les formes colorées au-dessus de chaque puit indiquent les fractions correspondantes du profil d'élution. C) Purification de rApoA-I par gradient par paliers en imidazole. La courbe bleue correspond à la DO à 280 nm et la courbe verte aux différents paliers en imidazole. D) Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie des différentes fractions de purification. Colonne de droite : marqueur de poids moléculaire, les formes colorées en dessous de chaque puit indiquent les fractions correspondantes du profil d'élution. Pour les profils chromatographiques, en abscisse est représenté l'absorbance à 280 nm en unité arbitraire et en ordonnée le volume d'élution.

L'analyse des profils chromatographiques montre la présence d'un pic d'élution unique pour la méthode d'élution par gradient linéaire (Figure 47 A). Pour la méthode d'élution par gradient par paliers, un pic est observé pour chaque palier d'imidazole. Plus la concentration d'imidazole est importante, plus le pic d'élution est intense (Figure 47 C).

L'analyse de gels SDS-PAGE 12 % des principales fractions d'intérêt du seul pic d'élution issu de la chromatographie utilisant le gradient linéaire montrent la présence systématique d'une bande autour de 27 kDa correspondant à l'ApoA-I. Une autre bande relativement intense à environ 100 kDa est également présente dans les principales fractions du pic d'élution (Figure 47 B) ainsi que de nombreuses protéines contaminantes de taille variable en plus faible quantité. En ce qui concerne les fractions issues des quatre pics d'élution correspondant aux quatre paliers d'imidazole, leur analyse

par SDS-PAGE 12 % montre la présence de la bande principale autour de 27 kDa avec des bandes de plus haut poids moléculaires (au-dessus de 40 kDa) pour les trois premiers pics d'élution (Figure 47 D). Dans le dernier pic d'élution, la bande principale à 27 kDa apparaît de façon très majoritaire attestant de la présence de l'ApoA-I avec une pureté élevée. Ce sont les fractions correspondant à ce pic que nous allons récupérer pour la suite. L'utilisation en parallèle de ces deux méthodes d'élution a permis de déterminer que la méthode d'élution par gradient par paliers est la plus appropriée dans notre étude.

La purification des différents mutants de l'ApoA-I ainsi que toutes les autres purifications ont donc été effectuées en utilisant cette méthode qui permet d'obtenir une protéine quasiment pure (Figure 48).

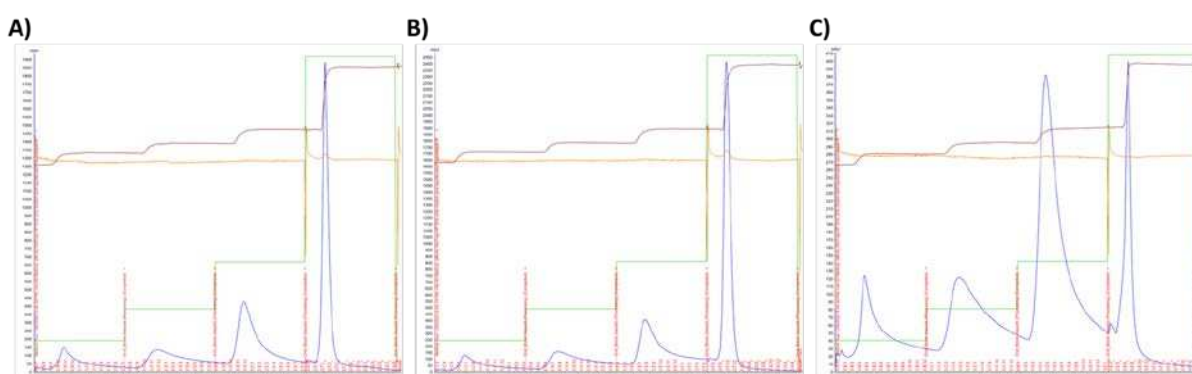


Figure 48 ; Profil d'élution gradient par palier en imidazole des mutants de l'ApoA-I par chromatographie d'affinité. A) Profil d'élution de l'ApoA-I Milano (R173C), B) de l'ApoA-I A158E et C) de l'ApoA-I V156K. La courbe bleue correspond à la DO à 280 nm et la courbe verte au gradient d'imidazole. Pour les profils chromatographiques, en abscisse est représenté l'absorbance à 280 nm en UA et en ordonnée le volume de rétention.

Comme pour l'ApoA-I_{WT}, les profils d'élution pour chaque mutant présentent quatre pics avec une bonne séparation et dont le dernier pic correspond à la protéine pure.

4. Clivage de l'étiquette Histidine par la protéase TEV : optimisation de la température et de la durée

Une fois purifiée, l'étape de clivage de l'étiquette histidine est nécessaire afin d'obtenir la protéine similaire à l'ApoA-I plasmatique mature. Pour les étapes suivantes, c'est-à-dire le clivage et par la suite la reconstitution des nanoparticules, nous nous sommes concentrés uniquement sur l'ApoA-I_{WT} car ces étapes ont nécessité de nombreuses mises au point.

La TEV ayant été produite au sein du laboratoire, sa fonctionnalité a été préalablement testée sur une petite quantité de protéines (2 mg) avant d'augmenter cette quantité. Deux températures d'incubation ont été testées : 4 °C et 30 °C (Figure 49 A). L'analyse des échantillons en SDS-PAGE permet de montrer qu'après 20 h d'incubation à 4 °C, le clivage de la TEV est partiel comme l'attestent

les deux bandes vers et sous 28 kDa correspondant respectivement aux formes non clivée et clivée de la protéine. La bande unique pour l'échantillon correspondant à l'incubation à 30 °C témoigne d'un clivage total. Ces résultats montrent que la TEV produite au laboratoire est non seulement fonctionnelle, mais également que son activité est optimale à 30 °C.

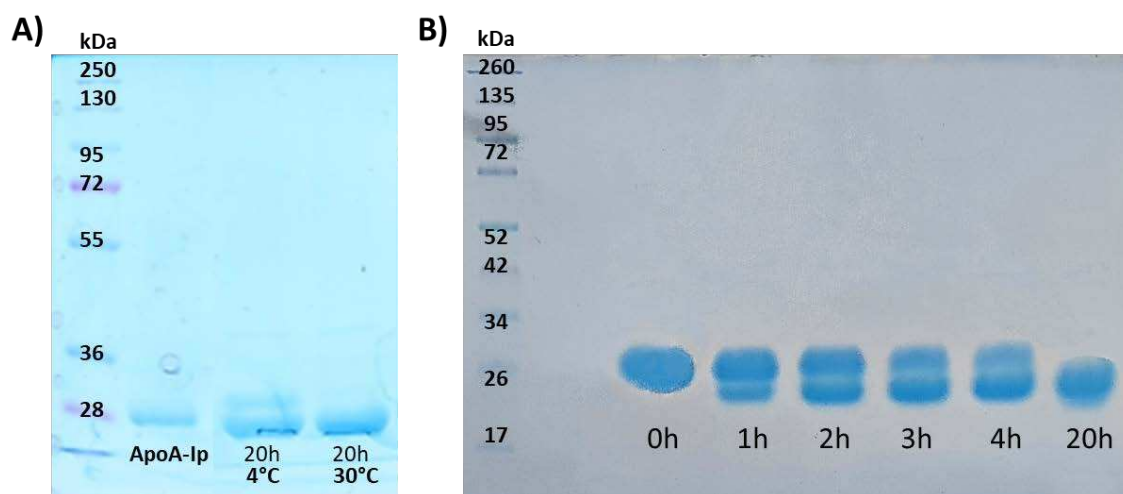


Figure 49 : Clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV. A) Clivage de l'étiquette Histidine effectué sur une petite quantité d'ApoA-I à 4 °C et à 30 °C pendant 20 h, puis B) Cinétique effectuée à 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 20 h à 30 °C.

Le clivage de l'étiquette est une étape importante pour obtenir une protéine semblable à l'ApoA-I plasmatique mature. Une partie de la protéine sera alors clivée et l'autre partie sera gardée avec l'étiquette afin de déterminer si sa présence a un impact sur les propriétés de la protéine. Les deux formes serviront alors à la production de nanoparticules.

Un clivage sur une plus grande quantité d'ApoA-I effectué à 30 °C à différents temps d'incubation a permis d'optimiser le temps d'incubation minimal requis pour un clivage total (Figure 49 B). Les résultats en SDS-PAGE montrent que le clivage est partiel jusqu'à 4 h d'incubation et total à 20 h. Les conditions de clivage choisies pour la suite des expérimentations sont donc de 30 °C pendant 20 h.

5. Purification de l'ApoA-I recombinante après clivage de l'étiquette histidine

La purification suite au clivage de l'étiquette histidine est importante afin d'éliminer les protéines non clivées, les étiquettes histidine libres, ainsi que la protéase TEV. La chromatographie d'affinité HisTrap apparaît ici comme la méthode de purification la plus appropriée car la protéase TEV porte également une étiquette histidine qui permettra facilement son élimination.

Le profil chromatographique obtenu après la purification est caractéristique de celui d'une protéine correctement clivée (Figure 50). En effet, l'analyse de ce profil montre deux pics d'élution bien séparés.

Le premier pic, observé durant la phase de chargement, correspond à l'ApoA-I clivée puisqu'elle sort directement sans être retenue par la colonne d'affinité. Le deuxième pic, observé dans la phase d'élution, correspond à une faible proportion d'ApoA-I non clivée qui a été retenue par la colonne, ainsi qu'à d'autres molécules ayant une affinité pour le nickel, telles que la protéase TEV et les étiquettes histidine libres.

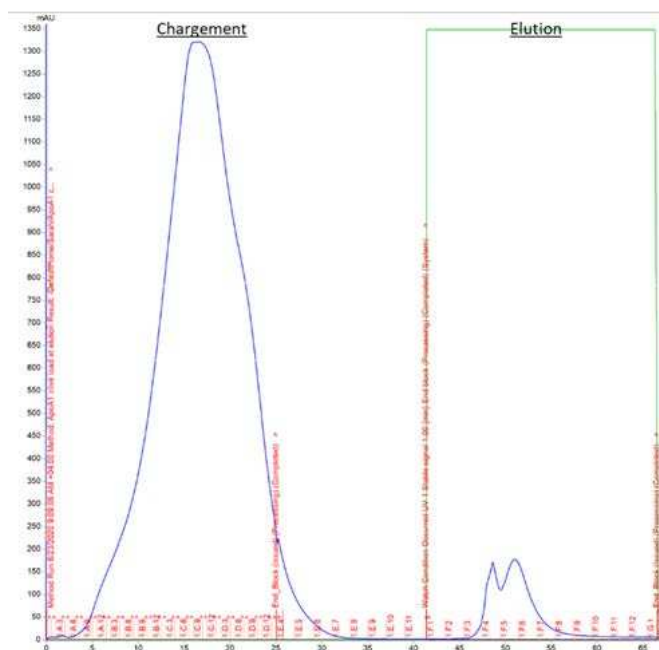


Figure 50 : Purification de l'ApoA-IWT après clivage de l'étiquette histidine par la protéase TEV. L'échantillon a été déposé sur la colonne HisTrap et élué avec 500 mM d'imidazole. La courbe bleue correspond à la DO à 280 nm et la courbe verte correspond au palier d'imidazole à 500 mM. Pour le profil chromatographique, en abscisse est représenté l'absorbance à 280 nm en UA et en ordonnée le volume de rétention.

Après avoir clivé l'étiquette histidine et purifié la protéine recombinante par chromatographie d'affinité, la détermination de la masse moléculaire par spectrométrie de masse et l'analyse de la structure de la protéine par RMN ont permis de confirmer que nous avons effectivement obtenu l'ApoA-I recombinante (voir l'article ci-après).

B. Reconstitution de nanoparticules de rHDL : optimisation du ratio ApoA-I:POPC

L'étape de reconstitution des nanoparticules consiste à mettre en contact l'ApoA-I recombinante avec les phospholipides. Les essais préliminaires ont été effectués en utilisant un ratio molaire de 1:100 (rApoA-I:POPC). La taille et la distribution des rHDL déterminées par DLS ont montré que les nanoparticules obtenues ont une taille moyenne voisine de 40 nm, ce qui correspond à une taille supérieure à celle des HDL qui se situe entre 7 et 13 nm (Figure 51). Ces résultats montrent que nos nanoparticules sont anormalement structurées. Cette reconstitution des nanoparticules a été réalisée

de nombreuses fois dans les mêmes conditions pour donner systématiquement une taille autour de 40 nm.

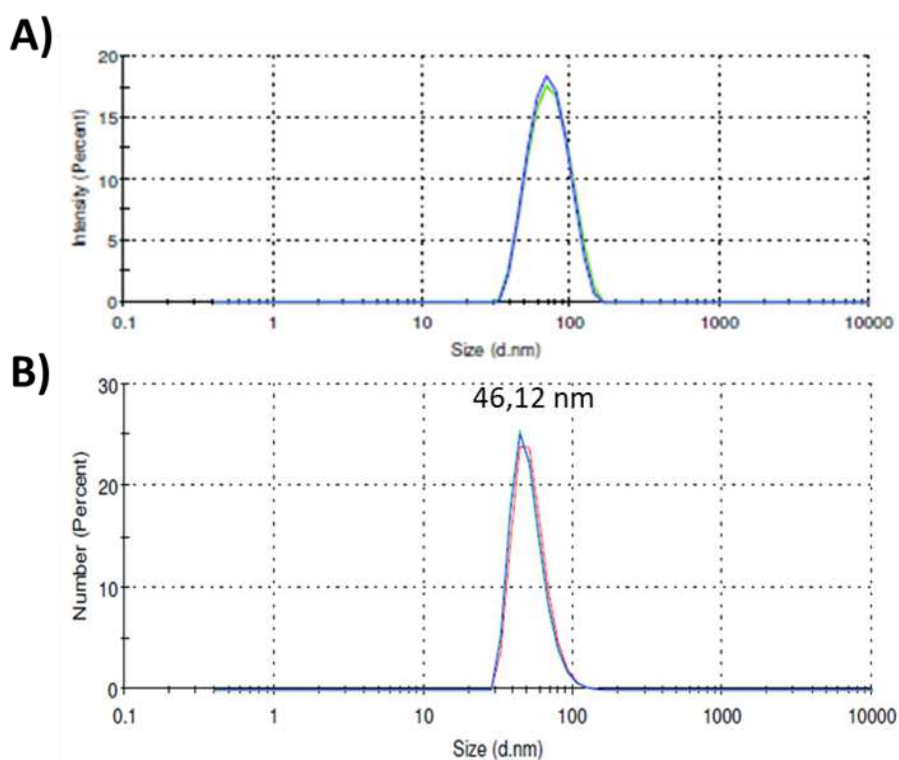


Figure 51 : Analyse de la taille des nanoparticules de rHDL par DLS. Distribution de la taille des particules en intensité A) et en nombre de particules B) déterminée par analyse DLS.

Partant de l'hypothèse que la taille des nanoparticules reconstituées est en lien avec la quantité de phospholipides ajoutée, différents ratios rApoA-I:POPC ont été testés (1:50, 1:75, 1:100, 1:125) avec le même protocole de reconstitution (Figure 52). L'analyse des profils de DLS montre que la reconstitution de rHDL avec les ratios molaires 1:50 et 1:75 permet d'obtenir respectivement des nanoparticules de taille de 7,3 et de 7,5 nm (Figure 52 E,F). En revanche, pour les ratios de 1:100 et de 1:125, les tailles obtenues sont respectivement de 43,2 et de 45,9 nm (Figure 52 G,H). La taille des nanoparticules augmente donc avec la quantité de phospholipides. Cependant, l'indice de polydispersité (Pdl) est d'environ 0,5 pour les reconstitutions issues des ratios 1:50 et 1:75 et seulement de 0,1 pour celles issues des ratios 1:100 et 1:125. Cet indice permet d'évaluer l'homogénéité des particules en suspension. Un indice inférieur à 0,2 signifie que la taille des particules dans la solution est homogène et une valeur supérieure à 0,2 reflète une plus grande hétérogénéité. Cet indice est cohérent avec les profils de distribution en intensité observés. En effet, pour les ratios 1:50 et 1:75, nous observons la présence de deux populations de tailles différentes, tandis qu'une seule population est observée pour les ratios 1:100 et 1:125.

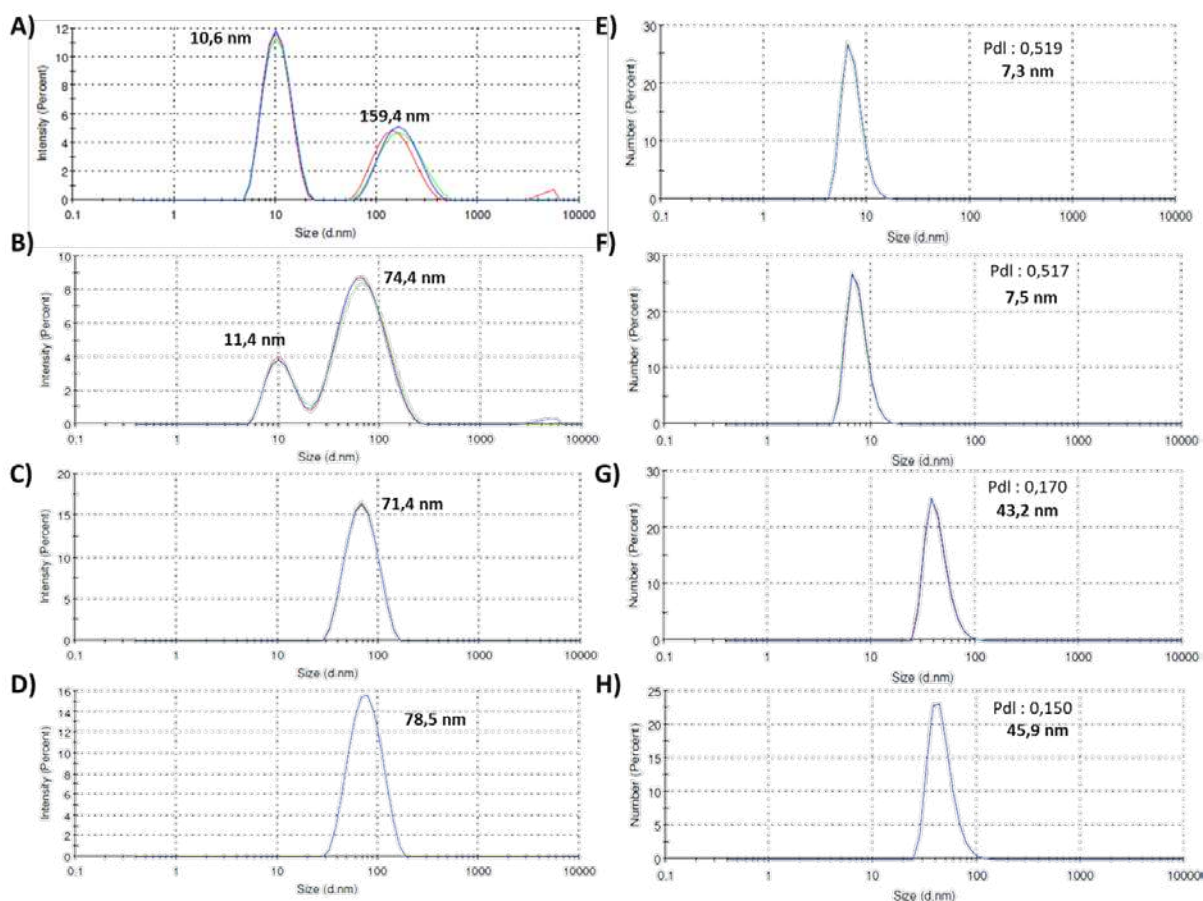


Figure 52 : Analyse par DLS de la taille des nanoparticules de rHDL reconstituées à partir de différents ratios de protéines:phospholipides. Distribution de la taille des particules en intensité à gauche (A, B, C et D) et en nombre à droite (E, F, G, et H) pour les ratios A,E) 1:50, B,F) 1:75, C,G) 1:100, D,H) 1:125.

Etant donné que l'indice de polydispersité est élevé pour les deux reconstitutions présentant une taille autour de 7 nm (ratios 1:50 et 1:75), il apparaît nécessaire d'effectuer une étape de chromatographie par exclusion de taille afin de séparer les nanoparticules en fonction de leur taille et d'obtenir ainsi une solution en nanoparticules plus homogène.

Les profils de chromatographie par exclusion obtenus pour les quatre reconstitutions montrent la présence de deux pics principaux bien séparés pour chaque ratio (Figure 53). Le premier pic observé à un volume d'élution autour de 16-18 mL correspond aux nanoparticules de grandes tailles (40 nm) et le deuxième pic, visible à un volume d'élution au-delà de 28 mL (28 à 36 mL), correspond aux nanoparticules de plus petite taille (7 à 13 nm). Pour les ratios 1:50 et 1:75, le pic correspondant aux nanoparticules de grande taille est très peu intense, attestant de la très faible quantité de cette catégorie de nanoparticules. Pour les ratios 1:100 et 1:125, ce même pic apparaît plus intense, témoignant de la quantité relativement importante de particules de grande taille et confirmant les résultats obtenus en DLS. Par ailleurs, la présence d'un deuxième pic principal au-delà de 28 mL pour tous les ratios montre la présence de particules autour de 7 nm dans toutes les conditions.

Au regard de ces résultats, nous avons choisi, pour la suite de l'étude, le ratio ApoA-I:POPC de 1:75 pour reconstituer les nanoparticules. En effet, dans ces conditions, la majorité des nanoparticules obtenues présentent une taille autour de 7 nm avec une quantité négligeable de particules de grande taille. Ceci permettra de s'affranchir de l'étape de chromatographie d'exclusion de taille pour isoler les nanoparticules d'intérêt.

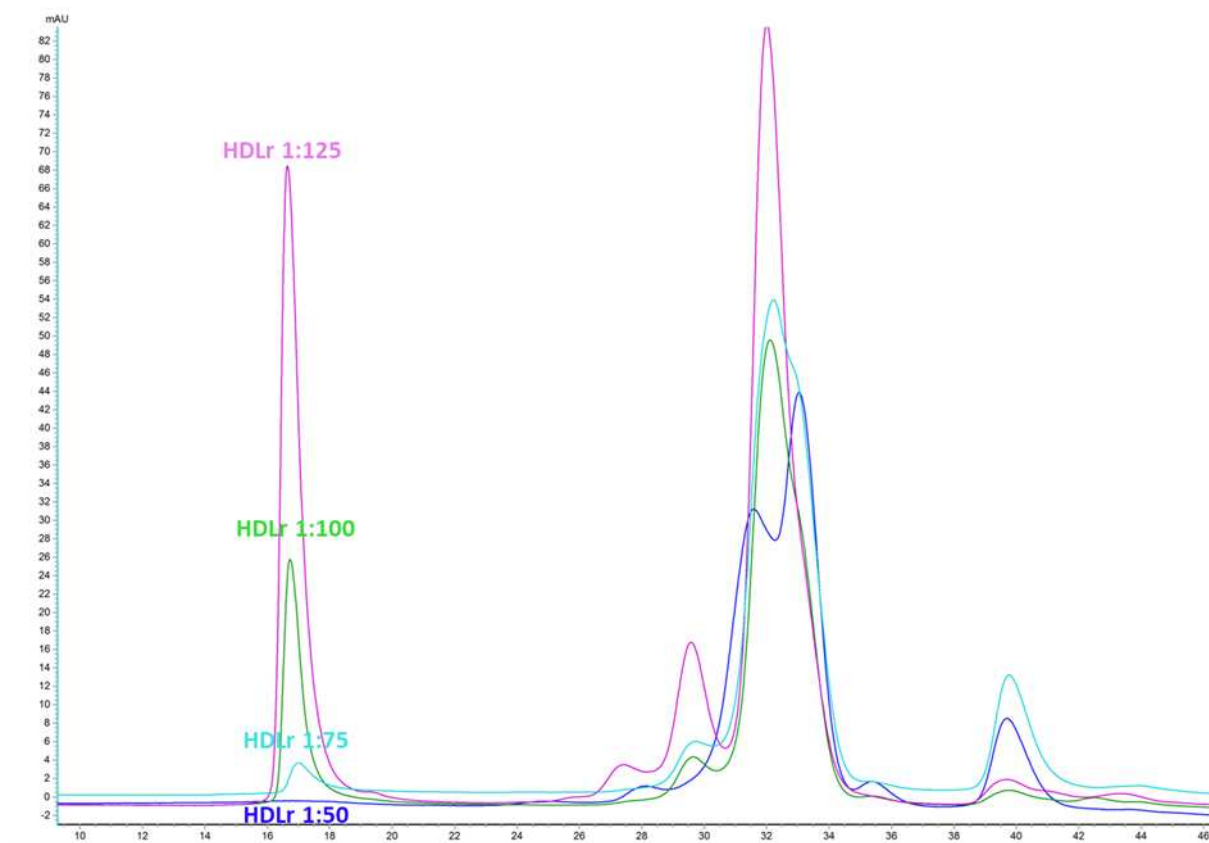


Figure 53 : Profil de purification des rHDL obtenues avec différents ratios rApoA-I:POPC par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superose 6 Increase. Les différentes solutions ont été purifiées sur une colonne Superose 6 afin de séparer les particules de différentes tailles présentes dans la solution. Pour les profils chromatographiques, en abscisse est représenté l'absorbance à 280 nm en UA et en ordonnée le volume d'élution.

Tous les résultats présentés ci-dessus constituent les différentes étapes de mise au point ayant été effectuées afin d'obtenir de façon reproductible et homogène des nanoparticules d'ApoA-I recombinante de bonne taille (7 à 12 nm) utilisées pour la suite de l'étude.

C. Caractérisation, propriétés et biodisponibilités de des nanoparticules d'ApoA-I recombinante

Les résultats de la caractérisation des rHDL par RMN, TEM et DLS, les tests des propriétés protectrices ainsi que la biodisponibilité des nanoparticules ont fait l'objet d'un article en cours de soumission intitulé « **Production, characterization and aerosolization of therapeutic high density lipoproteins-like with or without histidine Tagged recombinant ApoA-I** ».

Production, characterization and aerosolization of therapeutic high-density lipoproteins-like with or without histidine tagged recombinant ApoA1

Sarah Rosanaly^a, Marie Laurine Apalama^a, Matthieu Bringart^a, Joël Couprie^a, Pierre Giraud^a, Olivier Meilhac^{a,b}, Benoit Allard^a and Philippe Rondeau^a *

^a Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROI), Saint-Denis de La Réunion, France

^bCentre hospitalier universitaire de La Réunion, Saint Denis, France.

*** Corresponding author**

DÉTROI - Université de la Réunion - CYROI

77 Avenue du docteur Jean Marie Dambreville

97410 Saint Pierre

La Réunion – France - Tel: +262(0) 2 62 93 86 43 Fax +262 (0) 2 62 93 88 01

rophil@univ-reunion.fr

Abstract

High-density lipoproteins (HDL) have long been associated with protection against cardiovascular events, due to ApoA1, its major protein, which gives them their antioxidant, anti-inflammatory and anti-infectious properties. Several studies have shown an inverse correlation between HDL levels and development of cardiovascular disease. For this reason, numerous interventional clinical trials have been carried out with the aim of increasing circulating HDL levels, notably by intravenous supplementation with reconstituted nanoparticles composed of ApoA1 and phospholipids (rHDL), to treat the inflammatory syndromes at the origins of the main complications. In this study, we chose to develop ApoA1 production in bacteria lacking active endotoxins, in order to reconstitute ApoA1 nanoparticles and explore original administration routes such as inhalation. rHDL were prepared following a protocol using sodium cholate dialysis by combining purified and characterized recombinant ApoA1 (rApoA1) with phosphatidylcholine in a 1:75 molar ratio. NMR showed that rApoA1 conformation was similar to plasma ApoA1, both in the lipid free state and in the nanoparticles. Dynamic light scattering and electron microscopy techniques revealed that the nanoparticles obtained were about 7 nm in size and had a morphology similar to the natural pre- β -HDL. Functional characterization on endothelial (EA.hy926) and epithelial (A549) cells showed rapid internalization of rHDL while preserving cell viability. In addition, EA.hy926 incubated with rHDL showed a decrease in the expression of the cytokine IL-6 and the adhesion molecule ICAM-1, attesting the anti-inflammatory and endothelial protection capacity of nanoparticles. In conclusion, our rHDL produced from recombinant ApoA1 exhibit protective effects and their homogeneous distribution within the lungs and the absence of cytotoxicity suggest that they could be used to treat inflammatory diseases.

Keywords: rHDL, apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, nanoparticles, vectorization, aerosolization, inflammation

Introduction :

High-density lipoproteins (HDL) have long been associated with protection from cardiovascular events, including ischemic heart disease [1, 2]. HDL are composed of lipids and proteins, the main one being apolipoprotein A-I (ApoA1). They are known to reverse transport cholesterol from peripheral tissues to the liver to promote its elimination by the biliary route [3]. Clinical studies showing an inverse association between HDL levels and cardiovascular disease are based primarily on the levels of cholesterol contained in these particles (HDL-C). However, ApoA1, which constitutes more than 60% of the protein mass of HDL, also has vasculo-protective functions, conferring antioxidant, anti-inflammatory, anti-infectious, or anti-apoptotic properties to HDL, which it carries alone or in combination with other proteins that compose HDL [4]. Numerous clinical investigations have focused on increasing circulating HDL levels, either by pharmacological means with drugs acting on endogenous HDL metabolism or by intravenous supplementation with reconstituted HDL composed of ApoA1 and phospholipids (rHDL) [5, 6]. These approaches, although leading to an increase in HDL-C levels in target subjects, did not reduce cardiovascular mortality. A large-scale study is still underway to determine the effectiveness of injections of reconstituted rHDL (here CSL112) in more than 18,000 coronary subjects [7]. Beyond the disappointing effects of increasing HDL levels (by any means) in cardiovascular disease, many preliminary studies show beneficial effects of ApoA1 and rHDL in acute situations of moderate or severe inflammation. For example, we have shown that HDL injections in the acute phase of ischemic stroke could decrease the size of cerebral infarction or limit hemorrhagic complications [8, 9]. In 3 models of sepsis, injection of rHDL reduced mortality and inflammation in mice [10-12]. Similarly, rHDL have been injected in humans in various pilot studies, in metabolic disorders [13-15] and more recently in COVID-19 [16, 17], showing improvements in inflammatory profiles. Several pharmaceutical companies produce synthetic HDL which are composed of ApoA1 and phospholipids of variable composition (CSL Behring, Abionyx for example). ApoA1 can come from blood bank plasma pools or can be produced by genetic engineering. This last method allows ApoA1 to be modified to improve its effects (production of gain-of-function variants) or to follow it after administration by adding a label. We have chosen to develop the production of ApoA1 in bacteria devoid of active endotoxins in order to reconstitute ApoA1 nanoparticles and to explore original administration routes such as inhalation. The development of production techniques of these nanoparticles will allow us to modulate their composition by varying the ApoA1 and the phospholipids, then in a second time

to enrich them with protective molecules according to the target pathologies to improve their therapeutic properties.

Materials and methods :

1. Materials

MA145 ClearColi® BL21(DE3) bacteria were obtained from Lucigen and the kanamycin from EUROMEDEX. LB broth medium, Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), and 2-Oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) were purchased from Sigma-Aldrich. Antibodies against ApoA1 were obtained from Calbiochem and against Histidine-Tag were purchased from Abcam. Histidine-tagged protein purification 5 mL columns (HisTrap HP) and Gel Filtration Superdex® 200 Increase 10/300 GL were obtained from GE Cytiva. Sodium Cholate was purchased from Bio Basic. SOC medium and 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI_{C18}) dye were purchased from Thermofisher.

2. Plasmid constructs

A pET28a plasmid encoding the sequence of a mature human ApoA1 (243 amino acids) was designed by Gene Cust France and the nucleic acid sequence was optimized for an overexpression in bacteria (codon optimized ApoA1 sequence). A short sequence encoding for the TEV cleavage site (ENLYFQG) was added upstream the ApoA1 gene sequence to allow cleavage of the N-terminal 6x His-tag sequence encoded by the pET28a vector ([Supplementary Figure S1](#)).

3. Production of recombinant ApoA1

Escherichia coli bacterial competent cell

Non competent *Clear coli* bacteria were cultured in 250 mL LB broth medium [18]. The bacterial growth was monitored by spectrophotometry at 600 nm until the OD₆₀₀ reached 0.55. Cells were then harvested by centrifugation at RT, for 10 minutes at 3 900 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 80 mL of Inoue buffer (PIPES 10 mM pH 6.7, MnCl₂ 55 mM, CaCl₂ 15 mM and KCl 250 mM). The sample was centrifuged again at RT, for 10 minutes at 3 900 g, and the pellet was resuspended in 20 mL of Inoue buffer. 1.5 mL of sterile DMSO was added and the sample was left on ice for 4 hours.

Transformation and induction

The ApoA1 pET28a plasmid vector was used to chemically transform competent *Clear coli* cells by heat shock as described below. About 2 μ L (100 ng) of plasmids were added to 50 μ L of competent bacteria suspension and the mixture was consecutively incubated on ice for 30 minutes then at 42°C for 30 seconds. The solution was then left on ice for 2 minutes, 250 μ L of SOC medium pre-heated to 42°C were added and the mixture was incubated at 37°C for 1h. Transformed *Clear coli* cells were cultured on selective LB-broth agar medium plates containing 30 μ g/mL kanamycin and incubated overnight at 37°C to select transformed clones. Isolated colonies from transformed vectors were selected and inoculated in 10 mL of liquid LB media containing 30 μ g/mL kanamycin. This bacterial inoculum was then used for pre-culture in 200 mL of LB medium supplemented with 200 μ L kanamycin (30 μ g/mL) at 37°C with 200 rpm shaking. After overnight incubation, the preculture was diluted into 1 L of LB medium (supplemented with 30 μ g/mL kanamycin) at an initial absorbance of 0.4 at 600 nm (OD600). The culture was then incubated at 37°C with 200 rpm agitation and the bacterial cells were grown until the OD600 reached 0.6 and 0.8. Induction of T7 RNA polymerase expression of ApoA1 was initiated by adding Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 1 mM. Bacteria cells were harvested after an additional 4 h incubation at 37°C (200 rpm shaking) by centrifugation for 20 min at 4 000 g and 4°C.

Purification and cleavage

The pellet was resuspended in 20 mL of lysis buffer (0.1 mg/mL lysozyme in phosphate buffer Saline (PBS), pH 7.4) per liter of bacterial culture. The mixture was incubated at 4°C for 30 minutes followed by sonication (5 minutes, 4 seconds ON and 10 seconds OFF, power 60%) to disrupt the cells. The cell lysates were centrifuged for 20 minutes at 12 000 g at 4°C and the supernatant containing recombinant ApoA1 was collected.

Recombinant ApoA1 was purified by affinity chromatography on an AKTA PURE 25 system (GE Healthcare) using a 5 mL HisTrap HP column. Loading buffer (A) and elution buffer (B) consisted of PBS containing 20 mM imidazole at pH 7.4, and 500 mM of Imidazole pH 7.4, respectively. Then, the supernatant was applied to the HisTrap affinity column and a chromatographic method with a four steps gradient was used. Fractions were collected and analyzed by SDS-PAGE and fractions containing ApoA1 protein were pooled and concentrated

by ultrafiltration on Amicon® Ultra-4 10K filters (MWCO=10 kDa) up to 2 mg/mL. The 6xHis-Tag grafted to ApoA1 was removed by using a homemade recombinant TEV protease also comprising a 6xHis N-terminal-Tag. TEV protease was added to His-tag-ApoA1 at a ratio of 1:100 (w/w), and the mixture was incubated at 30°C for different times (2 h, 4 h and 20 h). The cleavage efficiency was checked by SDS-PAGE and the sample was applied once again to the HisTrap column to separate cleaved and to retain the noncleaved ApoA1 and the TEV as described previously.

4. SDS PAGE and Western Blot analysis

The overexpression (lysed cell pellet and supernatant after centrifugation) of ApoA1, and the efficiency of cleavage of the histidine Tag were checked on a SDS-12 % PAGE and by Western Blot. Ten µg of proteins (cleaved and noncleaved) were separated by SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane for immunoblot analysis or stained with Coomassie blue. For the immunoblot analysis, the proteins were first blocked overnight at 4°C with 5% (w/v) non-fat dry milk in TRIS-buffer containing 0.1% (v/v) Tween 20 (TBS-Tween), before an incubation with the primary rabbit-anti-human ApoA1 (Calbiochem, 1/500 dilution) or the primary mouse-anti-His-Tag (Abcam, 1/1000 dilution) for 2 hours at RT. Nitrocellulose membranes were then incubated with the corresponding HRP conjugated secondary antibodies for 1 hour. Between each step of incubation, membranes were washed three times with PBS/0.1% Tween 20 buffer. Protein detection was performed using the enhanced chemiluminescence reagent (ECL, GE Healthcare) and Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

5. NMR analysis of purified ApoA1

Plasma ApoA1 (pApoA1), purified noncleaved and cleaved recombinant ApoA1, plasma HDL and rHDL were analyzed on a 600MHz BRUKER Avance III NMR spectrometer equipped with a $^1\text{H}/^{19}\text{F}$, ^{13}C and ^{15}N cryoprobe to check the structure of the protein. For that, 50 µL of deuterium oxide (D_2O) and 2 µL of TMS (used as reference) were added to 500 µL of protein concentrated at 600 µM. 1D ^1H , 2D TOCSY and 2D NOESY spectra were recorded at 37°C. Spectra were recorded with a sweep width of 10 ppm and the carrier was placed at 4.7 ppm and analyzed with Topspin 3.6.

6. Mass spectrometry for ApoA1 characterization

Purified cleaved and noncleaved recombinant ApoA1 were analyzed in a Q-Exactive plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Before mass spectrometry analysis, the samples were desalted using the « ZebaTM Micro Spin Desalting Columns » method. Briefly, 2 to 12 μL of samples were applied to the top of the compact resin bed of the desalting column. Then, 3 μL stackers of ultrapure water were applied after the sample was absorbed. Finally, centrifugation at 1000 g for 2 minutes was carried out to collect the desalted sample. After desalting, the sample was dried and resuspended in 60 % of water, 40 % acetonitrile and 0.1 % formic acid. Direct infusion protein sample (1 ppm) Orbitrap measurements was carried out by using ESI probe from Thermo Fisher Scientific and the following parameters were applied: positive ionization, intact protein mode, resolution of 140 000, capillary temperature of 300 °C, sheath and auxiliary flow rate of 15 and 5 respectively, mass scan range of m/z 1000 to 8000, flow rate of 5 $\mu\text{L}.\text{min}^{-1}$ and spray voltage of 4.00 kV.

7. rHDL and His-rHDL nanoparticles preparation

The reconstitution of nanoparticles was performed by the cholate sodium dialysis method and POPC (2-Oleoyl-1-palmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; Sigma) was used as a lipid source [19]. A molar ratio of 1:75 for ApoA1:POPC was prepared. Briefly, POPC (29.4 mg/mL) was dissolved in chloroform: methanol (2:1, v/v) and dried for 2 hours with nitrogen gas. After resuspending the lipids in 500 μL of TEN buffer (tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM), 387 μL of sodium cholate (30 mg/mL) was added to the POPC. Then, 10 freeze/thaw cycles were performed in order to promote multilamellar vesicles formation. Cleaved or uncleaved ApoA1 was added to the mixture followed by an incubation with shaking overnight at 37°C. The sample was dialyzed against the TEN buffer for 3 days (5 bath changes every 12 hours) at 4°C in order to eliminate the excess of sodium cholate. The resulting reconstituted HDLs were kept at 4°C until use. For the aerosolization experiment, the nanoparticles were prepared by addition of DiI_{C18}(3) fluorescent dye (20 mg/mL; Invitrogen) to POPC dissolved in chloroform:methanol (1:100, mol/mol). Labeled nanoparticles were then isolated by ultracentrifugation to eliminate free DiI_{C18} and sterile-filtered.

8. Dynamic Light Scattering Analysis

The particle size and distribution of reconstituted HDLs were recorded on a Dynamic Light Scattering (DLS) Zetasizer Nano (Malvern Instruments). The analyses were conducted in aqueous solution after filtration of rHDL samples (in TRIS 10 mM pH 8, NaCl 150 mM and

EDTA 1 mM buffer) through a 0.22 μm pore size PTFE syringe filter to remove small polymer aggregates. Each analysis was performed at 25°C in triplicate with an angle detection of 175°.

9. rHDL characterization by TEM microscopy

Transmission electron microscopy (TEM) analyses were performed at the Institute of Mineralogy, Physics of Materials and Cosmochemistry (IMPMC, University of Jussieu, Paris). The morphology and the size of nanoparticles were determined from negative staining images recorded on UltraScan 1000, 2k x 2k CCD camera (Gatan, USA), working with a LaB6 JEOL JEM2100 (JEOL, Japan) Transmission electron microscope operating at 200kV. The negative staining was achieved with 2% uranyl acetate solution. Commercial 300 mesh copper grids covered with a carbon membrane were used, Delta Microscopies France. The grid was glow discharged, Edwards Auto 306 United Kingdom, for 30 seconds to obtain an hydrophilic carbon surface for a better deposition. Then the solution of the different samples was deposited on the carbon grids. The negative staining was then obtained with a 2 % solution of Uranyl Acetate. After waiting for complete air-drying of the deposition of the carbon grids, they were mounted on a single tilt holder and introduced into the microscope to observe the different samples, JEOL Japan JEM 2100 Transmission Electron Microscope operating at 200 kV with a cryopole piece. The images were recorded on a Gatan USA camera UltraScan US1000 2k by 2k CCD camera.

12. Cell culture and stimulation

EA.hy926, A549 and bEnd.3 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA, CRL-2922™). Cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Pan Biotech, Germany) supplemented with 4.5 g/L glucose, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin and 250 g/mL amphotericin B. For EA.hy926 cells, the culture medium was also supplemented with HAT (100 mol/L hypoxanthine, 0.4 mol/L aminopterin and 16 mol/L thymidine). Cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. After reaching confluence, cells were serum-deprived for 3 h before stimulation by replacing the cell culture media by DMEM supplemented with 5% delipidated FBS.

13. Determination of rHDL uptake in cells

rHDL and His-rHDL uptake in EA.hy926, A549 and bEnd.3 cells was determined by immunochemistry. Cells were plated on a Millicell 8 well-glass slide (PEZGS0816 Millipore)

and incubated with rHDL or His-rHDL solutions (0.4 mg/mL). Immunofluorescence detection rHDL (ApoA1) was done as described below. Cells were washed three times with PBS, fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde solution and washed again with PBS. Cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 (in PBS) 2 times for 5 minutes, blocked with 1% BSA solution (in PBS) for 30 minutes and stained with primary rabbit anti-human ApoA1 (Calbiochem, 1/500 dilution). After overnight incubation at room temperature, cells were washed three times with PBS and incubated with secondary goat anti-rabbit Alexa 488 (Jackson, 1/2000 dilution) for 2 h at room temperature. The slides were rinsed 3 times with PBS and cell nuclei were stained with DAPI (Sigma, 0.1 µg/mL) for 20 min at room temperature. Slides were washed with PBS before mounting in fluorescence medium (Fluoromount, Thermofisher) and image captured using a NanoZoomer S60 digital slide scanner (Hamamatsu) or a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti2).

14. Neutral red test for cytotoxicity of nanoparticles

Neutral red colorimetric test was used for the quantitative assessment of cell viability following exposure to rHDLs. This test is based on the ability of viable cells to incorporate neutral red into lysosomes [20]. EA.hy926 cells were seeded in a 96-well plate (5×10^4 cells/well). After reaching the confluency and serum-deprived cells were stimulated with rHDLs or His-rHDLs (0.4 mg/mL) for 24 hours. Then, the medium was removed and the cells were washed 3 times with PBS. DMEM medium supplemented with 80 µg/mL neutral red was added to each well and cells were incubated for 2 hours at 37°C. After removing the medium, cells were washed 3 times with PBS and 200 µL of a destaining solution of water:ethanol 96%:acetic acid (50:50:1 v/v) was added in each well to solubilize the dye and absorbance read at 540 nm.

15. RNA extraction and RT-qPCR

EA.hy926 cells were seeded in a 6-well plate (3×10^5 cells/well). After reaching the confluency and serum deprivation step, cells were stimulated with rHDLs or His-rHDLs (0.4 mg/mL) for 6 hours in the absence or presence of TNFα (5 ng/mL). Total RNA was isolated with TRIzol™ reagent (Invitrogen). About 2 µg of total RNA were reverse-transcribed (RT) using Random hexamer primers and NxGen® M-MuLV (Lucigen). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using the BrightGreen™ master mix (ABM) and results analyzed using CFX96 system software (Biorad). The relative expression of pro-inflammatory cytokine IL-6 (Forward: GGT ACA TCC TCG ACG GCA TCT and Reverse: GTG CCT CTT TGC TGC TTT CAC) and adhesion protein ICAM-1 (Forward: GGC CTC AGT CAG TGT GA and

Reverse: AAC CCC ATT CAG CGT CA) was normalized to the expression of ribosomal 18S RNA (Forward: ATT AAG GGT GTG GGC CGA AG and Reverse: TGG CTA GGA CCT GGC TGT AT).

15. Quantification of IL-6 secretion by ELISA

EA.hy926 cells were seeded in a 12-well plate (1.10^5 cells/well). After reaching the confluency and serum-deprived cells were stimulated with rHDLs or His-rHDLs (0.4 mg/mL) for 24 hours in the absence or presence of TNF α (5 ng/mL). Cell culture media were collected and analyzed using human IL-6 ELISA Ready-SET-Go® assays (Thermofisher). Absorbance was measured using a microplate reader (FLUOstar Optima, BMG Labtech) at 450–570 nm.

16. rHDL and His-rHDL aerosolization

Seven weeks old C57B1/6 mice were fed *ad libitum* with standard laboratory chow and water. All animal experiments were approved by the local ethics committee (CYROI APAFIS#29999-2020062212483247v4). All mice were anesthetized using intraperitoneal (i.p.) ketamine (2.5 mg/kg) and isoflurane inhalation. Intratracheal administration started immediately after inhalation of isoflurane [21]. While the mouse remained in a standing position, 25 μ L of the solution was administered directly into the trachea using a microsyringe aerosolizer model YAN 30012 (Yuyan Instruments). Mice received either 25 μ L PBS solution, 25 μ L carbocyanine-labeled (DiI C_{18})-rHDL (4 mg/mL) or carbocyanine-labeled (DiI C_{18})-His-rHDL (4 mg/mL). The mice were warmed and observed until awake. After 6 hours, mice were sacrificed by exsanguination after isoflurane anesthesia.

17. Immunohistology

7 male mice (24.4–26.64 g) were studied. 4% paraformaldehyde (PFA) was used for washing and infusing the vascular compartment; engulfed lungs were then fixed overnight in 4% PFA, kept in 30% sucrose solution overnight, and then frozen in OCT at -80°C. Frozen sections (10 μ m) was obtained using a cryostat. OCT was rinsed with PBS and rinsed twice with PBS-Triton 0.1% for 10 minutes. After 1 hour blocking with 2% bovine serum albumin (BSA), primary antibody (1/500 dilution; 2.9 μ g/mL), rabbit anti-human ApoA1 antibody (Calbiochem) or non-relevant antibody (2.9 μ g/mL negative control rabbit Ig fraction Dako©) were incubated overnight in a humid chamber at room temperature (RT). After 3 washing steps with PBS-Triton 0.1%, secondary antibodies (dilution 1/1000, donkey anti-rabbit conjugated to Alexa 488, Invitrogen) and DAPI (1/500 dilution, 0.1 μ g/mL) were incubated at room

temperature for 1 hour. Images were observed on the NanoZoomer S60 digital slide scanner (Hamamatsu). For direct detection of DilC₁₈-labeled rHDL distribution, frozen sections were incubated only with DAPI (1/500 dilution, 0.1 µg/mL) before microscopic observation.

18. Statistical analysis

All the results are expressed as the mean +/- SEM of multiple experiments. Statistical analysis was achieved using Prism software (Prism software, GraphPad, USA). Significant differences ($p < 0.05$) between the means were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) procedures followed by Tukey's multiple comparison test, respectively.

Results :

1 Overexpression of ApoA1

1.1 ApoA1 overexpression monitoring

A schematic overview of the different steps starting from the expression, purification and cleavage of ApoA1 to the reconstitution of nanoparticles is shown in [Figure S2](#) (Supplementary data). ApoA1 overexpression in *Clear coli* was induced by IPTG, and then bacteria were pelleted, sonicated, and centrifuged to collect the soluble material. Samples of the bacterial suspension at different stages of induction and purification are examined by SDS-PAGE ([Figure 1A](#)). The fractions corresponding to bacterial samples after induction with IPTG (AI) and the supernatant (S) after centrifugation were found to contain the most ApoA1 as evidenced by a more intense band around 25-28 kDa (see red boxes), and confirmed by plasma ApoA1 migration (right side). The absence of an equivalent band in the pellet (P) attests that ApoA1 is mainly expressed as a soluble protein. Given that our recombinant protein expressed in bacteria contains a poly-histidine tag (His-tag), it was purified by HisTrap affinity chromatography. The different purification methods tested showed that a gradual change (four steps gradient) in elution strength in imidazole provided a better separation and purification of the His-tagged ApoA1 (His-ApoA1) (Supplementary [Figure S3](#)). After this purification step, Western blot analysis using a rabbit anti-ApoA1 antibody confirmed that the protein expressed in the soluble fraction was indeed ApoA1 ([Figure 1B](#)).

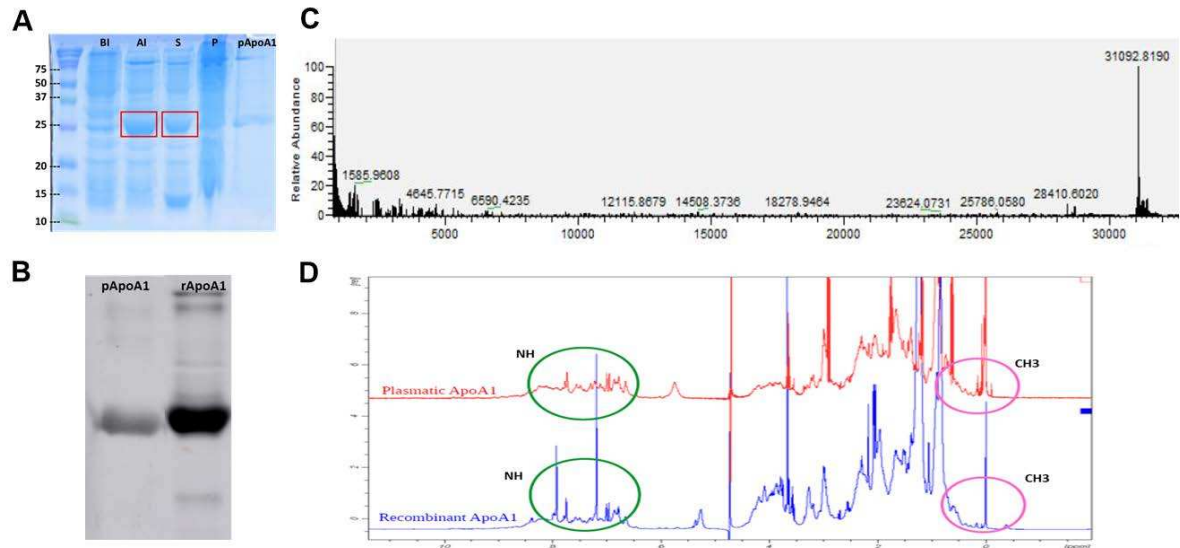


Figure 1. Overexpression of recombinant His-ApoA1. A) Coomassie blue staining after SDS-12% PAGE . Different samples were analyzed on the gel, BI : protein sample before IPTG induction ; AI : after IPTG induction ; S : supernatant ; P : pellet and pApoA1 : plasma ApoA1 used as control. The red boxes indicate the bands relative to the His-ApoA1 protein at 25-28 kDa. B) Western Blot analysis of plasma ApoA1 (pApoA1) and recombinant His-ApoA1 (rApoA1) by using a rabbit anti-human ApoA1 antibody. C) Extraction by deconvolution of the true mass spectrum of purified His-ApoA1. Purified His-ApoA1 was analyzed in full MS scan Q-exactive in intact protein mode. D) Identical 1D ^1H NMR spectra show evidence for no significant structural difference between the recombinant His-ApoA1 (bottom blue spectrum) and the plasma ApoA1 (top red spectrum).

Mass analysis of the whole protein on the Q-Exactive and deconvolution of the obtained total ion chromatogram (Figure 1C) show that the average molecular mass of the obtained protein is 31092.8190 Da, corresponding to the theoretical mass of the His-tagged ApoA1 (31092 Da). ^1H NMR was used to assess the folding state of the recombinant protein and to compare it with ApoA1 purified from plasma. The signal dispersion in both spectra highlights the presence of many peaks in the NH region (green circles) and the methyl region (pink circles) that attests the partial structuring of lipid free plasma and recombinant ApoA1 in solution. The similarity between the two spectra shows that His-ApoA1 has a similar structure to plasma ApoA1 (Figure 1D). All these results show that the protein overexpressed via the pET28a plasmid in the *Clear coli* strain corresponds to a purified His-ApoA1 with similar structure compared to plasma ApoA1.

1.2 Histidine Tag cleavage by TEV protease

In order to obtain a recombinant protein with the same primary sequence as plasma ApoA1, the His-ApoA1 tag was cleaved with the TEV protease. His-ApoA1 was incubated with the

protease at a ratio of 1:100 (TEV:protein (w/w)) for 2, 4 and 20 hours at 37°C and the corresponding samples were subjected to SDS-PAGE (Figure 2A). Analysis on the coomassie blue-stained gel of the samples at 2 and 4 hours of incubation with TEV showed two distinct bands at 28 kDa and 31 kDa corresponding to the cleaved and uncleaved forms of the protein, respectively. 24 hours of incubation with TEV protease were found to be sufficient for complete cleavage as evidenced by the single band at 28 kDa for the corresponding sample. Western blot analysis using an anti-His-Tag antibody showed the drastic decrease in intensity of the band relative to the protein tag following the incubation of His-ApoA1 in the presence of the TEV protease (Figure 2B).

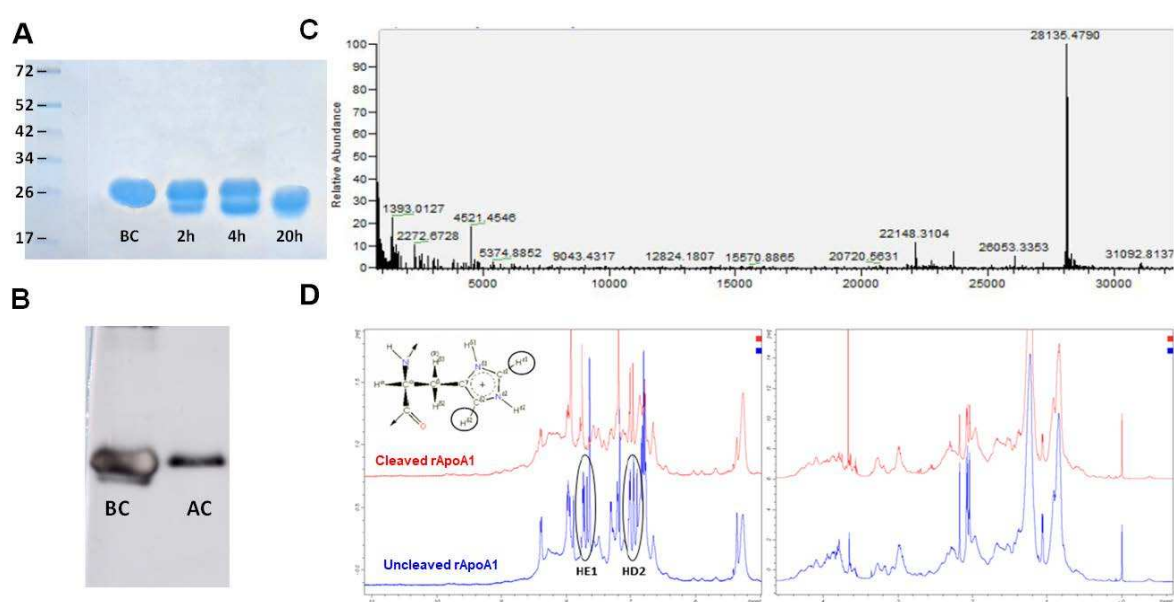


Figure 2. Cleavage of the histidine Tag does not affect the configuration of rApoA1. A) Coomassie blue staining of the different forms of rApoA1 protein by SDS-12% PAGE : uncleaved form (BC), the partial cleaved forms (2h and 4h) and the totally cleaved form (20h). B) Western Blot analysis of rApoA1 samples before and after cleavage (BC and AC)). The detection of the histidine Tag was performed by using a mouse anti His-Tag antibody. C) Extraction by deconvolution of the true Mass spectrum of the purified total cleaved rApoA1 by mass spectrometry analyzed in intact protein mode. D) Identical 1D ^1H NMR spectra for the totally cleaved form rApoA1 (red) and uncleaved form of rApoA1 (blue) show evidence for structural similarities. HE1 and HD2 circled in black correspond to the signal of the histidine Tag proton. Top left: molecular structure of histidine.

Characterization of the cleaved protein by mass spectrometry and subsequent deconvolution of the multiple charge state spectrum showed that the molecular mass of cleaved ApoA1 is 28 135.479 Da, exactly matching the theoretical mass of unlabeled ApoA1 (28 135 Da) (obtained via the nucleic acid sequence of the serial cloner software and the ExPASy translation tool) (Figure 2C). ^1H NMR analyses were performed on His-ApoA1 (uncleaved form) and ApoA1

(cleaved form) to assess the impact of histidine tag removal on the structure of recombinant ApoA1. The similarity in spectra between cleaved and uncleaved ApoA1, in particular in the amide, aromatic and methyl regions demonstrate that the cleavage occurred correctly without altering the structure of the protein (Figure 2D). The disappearance of the chemical shifts of the histidine label proton signals in cleaved ApoA1 in the HE1 (about 7.8 ppm) and HD2 (about 7 ppm) region (dark insets) confirms the efficiency of cleavage. All these results show that His-ApoA1 could be efficiently cleaved without altering the structure of the protein.

2. Production and characterization of rHDL nanoparticles

ApoA1 nanoparticles were reconstituted by mixing rApoA1, His-ApoA1 or lipid free plasma ApoA1 with POPC (at a molar ratio of 1:75) according to the sodium cholate method including freeze/thaw cycles. The particle size of nanoparticles was characterized by Differential Light Scattering (DLS) and visualized through Transmission Electron Microscopy (TEM) (Figure 3).

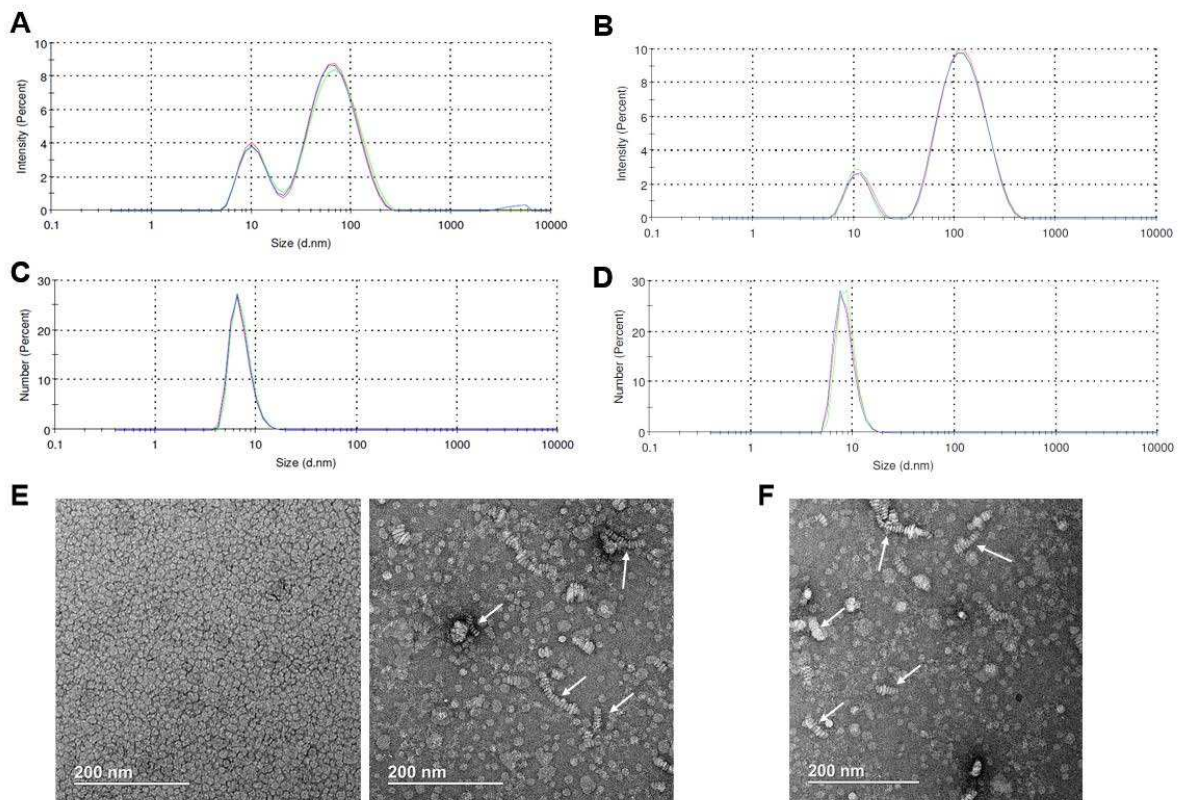


Figure 3. rHDL and His-rHDL display typical morphological structure of plasma HDL. Particles size distribution in intensity and in number of particles determined by DLS analysis for (A and C) rHDL and of (B and D) His-rHDL nanoparticles, respectively. Representative negative staining transmission electron microscopic (TEM) images of E) rHDL and F) His-rHDL nanoparticles. Images show that nanoparticles are spherical with a discoidal shape of about 8-10 nm in diameter. Some nanodiscs are also stacked in the form of rouleau (see arrows). Scale bar = 200 nm.

The intensity size of rHDL and His-rHDL were distributed between 7 and 120 nm (Figures 3A and B) with a low polydispersity (value below 0.2), but the majority of the particles presented an apparent size around 7-8 nm for both types of nanoparticles (Figures 3C and D). The particle sizes were confirmed by transmission electron microscopy, which showed the discoidal shape of the nanoparticles stacked in the form of “rouleau” (Figures 3E and F). NMR also demonstrated that rApoA1 conformation in rHDL was similar to plasma ApoA1 in nanoparticles (Supplementary Figure S4).

3. rHDL nanoparticles are taken-up by endothelial and epithelial cells

To investigate the uptake of rHDL and His-rHDL nanoparticles by endothelial (EA.hy926) and epithelial (A549) cells, we used an anti-ApoA1 antibody for their intracellular immunodetection. Figures 4A and 4B show that both rHDL nanoparticles are taken up by endothelial cells after 6 hours incubation.

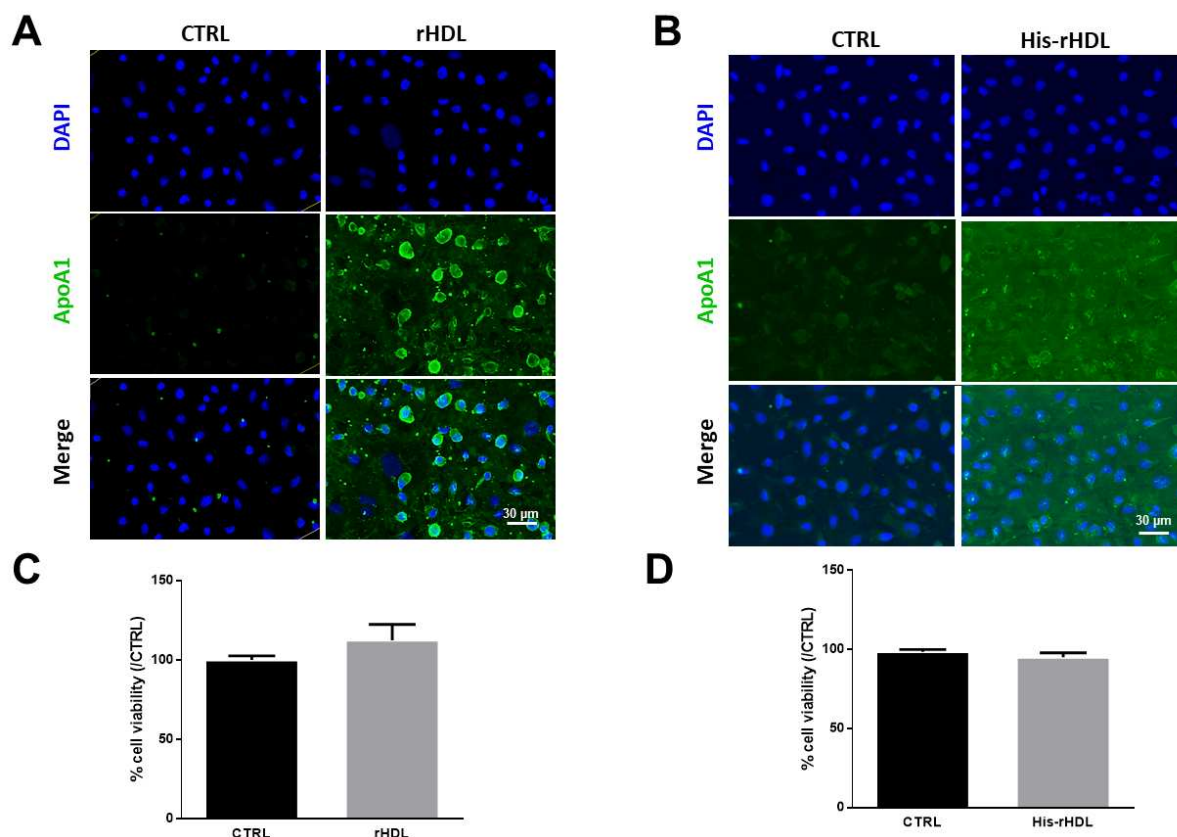


Figure 4. rHDL and His-rHDL nanoparticles are internalized by EA.hy 926 endothelial cells. Immunostaining of endothelial EA.hy926 cells after 6 hours incubation without (CTRL) or with 0.4 mg/mL of A) rHDL or B) His-rHDL nanoparticles. Rabbit anti-human ApoA1 antibody was used for labeling rHDL or His-rHDL (green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μ m. Cell viability after 24 hours incubation with C) rHDLs or D) His-rHDLs are expressed as a percentage of neutral red value compared with CTRL (DMEM). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

Indeed, ApoA1 was detected in endothelial cells and confocal microscopy analysis further confirmed the internalization of rHDLs (here His-rHDLs) by EA.hy926 cells (Supplementary Figure S5). We also found that rHDL nanoparticle uptake by endothelial cells occurred already after 2 and 4 hours of incubation (Supplementary Figure S6). It is important to note that endothelial cells viability was not affected by rHDL and His-HDL nanoparticles after 24 hours incubation (Figures 4C and D). The capacity of our rHDL nanoparticles to be taken up was confirmed using another type of endothelial cells : bEnd3 a model of microvascular endothelial cell (Supplementary Figure S7). A549 cells, a model of epithelial cells, also have this ability to take up our rHDL nanoparticles. After 6 hours of incubation with rHDL or His-rHDL, ApoA1 was detected within A549 cells reflecting this uptake (Figures 5A and B). For rHDLs, this uptake occurred after 2 hours and 4 hours incubation (Supplementary Figure S8) and for His-rHDL this uptake was increased after 20 hours in A549 cells (Supplementary Figure S9).

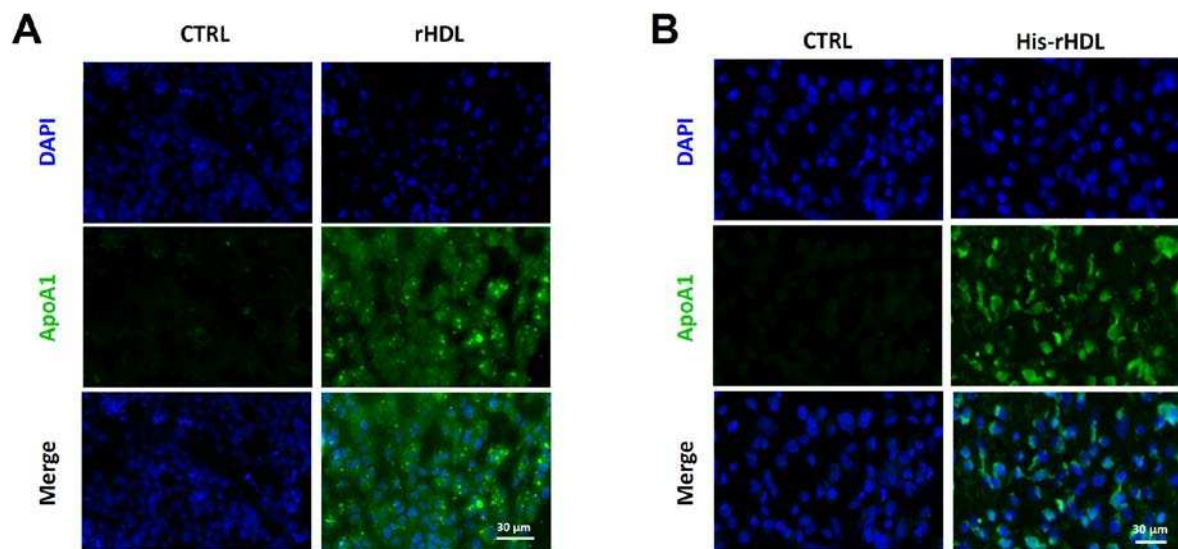


Figure 5. rHDL and His-rHDL nanoparticles are taken up by A549 epithelial cells. Immunostaining of epithelial A549 cells after 6 hours incubation without (CTRL) or with 0.4 mg/mL of A) rHDL or B) His-rHDL. Rabbit anti human ApoA1 antibody was used for labelling rHDLs or His-rHDLs (green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μ m.

4. rHDL nanoparticles reduce IL-6 and ICAM-1 expression in TNF α -induced endothelial activation

To determine the capacity of our rHDL particles to dampen TNF α -induced endothelial cells activation, EA.hy926 cells were exposed to TNF α (5 ng/mL) in the presence or absence of

rHDL or His-rHDL (0.4 mg/mL). After 6 hours of exposure, TNF α significantly increased the expression of IL-6 at the mRNA and protein levels (Figure 6A-D).

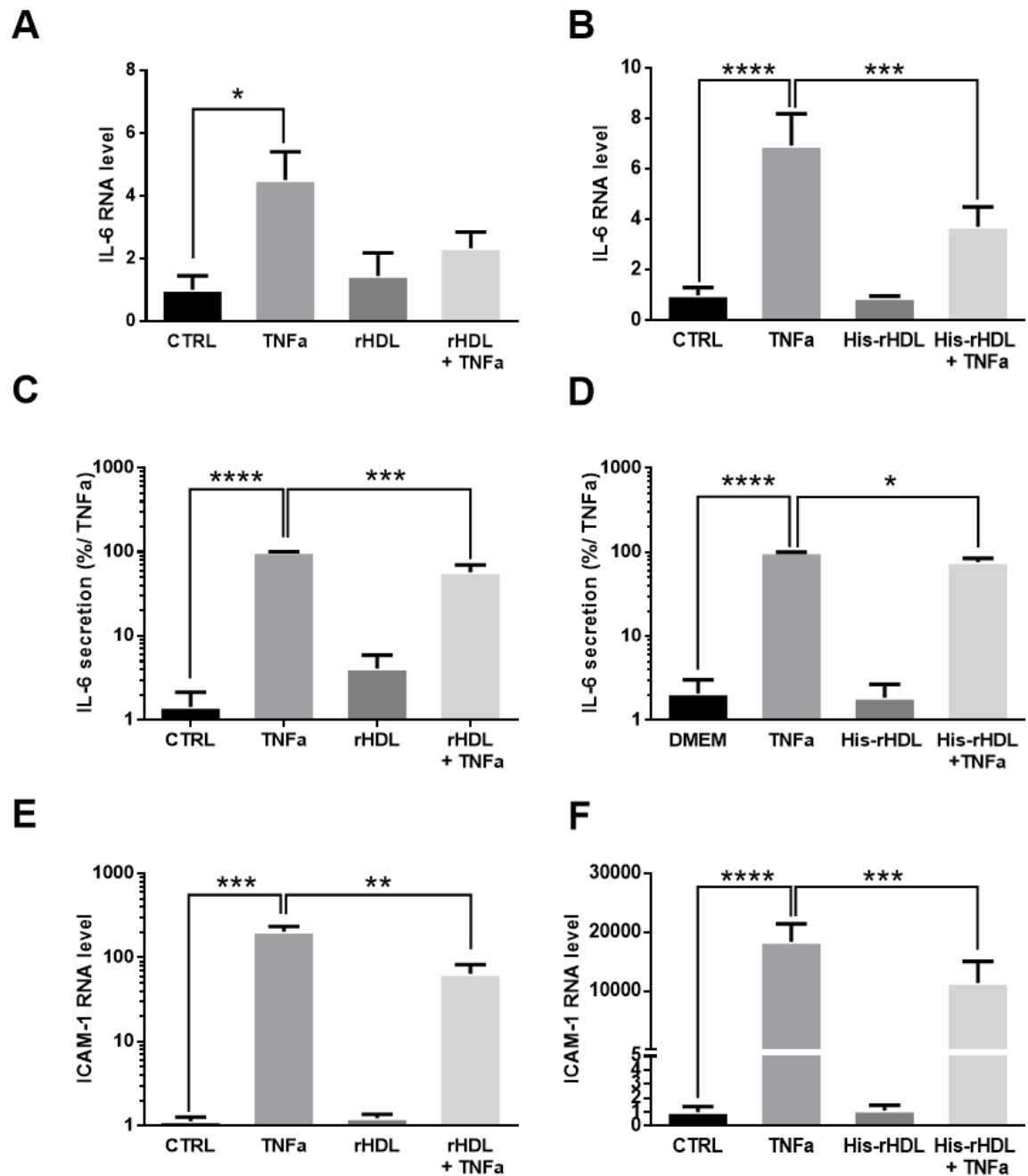


Figure 6. rHDL and His-rHDL nanoparticles prevent TNF α -induced IL-6 production and ICAM-1 expression by EA.hy926 endothelial cells. Relative gene expression of IL-6 by EA.hy 926 cells after 6 hours of incubation with A) rHDL or B) His-rHDL (0.4 mg/mL) in absence or presence of TNF α (5 ng/mL). IL-6 cytokine secretion by EA.hy 926 cells quantified by ELISA. Data are expressed as percentage of IL-6 secretion compared to the condition in the presence of TNF α . Cells were previously co-incubated for 24 hours with C) rHDL or D) His-rHDL (0.4 mg/mL) in absence or presence of TNF α (5 ng/mL). Relative gene expression of ICAM-1 and by EA.hy 926 cells after incubation for 6 hours with E) rHDL (0.4 mg/mL) or F) His-rHDL in the absence or presence of TNF α (5 ng/mL). Data are the mean $\pm$ SEM of three independent experiments. **p<0.01 ; ***p<0.001 ; ****p<0.0001.

While His-rHDL significantly decreased IL-6 expression at both levels, the decrease of IL-6 with rHDL did not reach statistical significance at the mRNA level. As a result, TNF α induces an increase of IL-6 secretion after 24 hours exposure and this increase was significantly reduced in the presence of rHDL as well as His-rHDL (Figures 6C and D). Similarly, TNF α -induced endothelial activation as evidenced by the marked increase in the expression of ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), which was limited by both rHDL and His-rHDL treatment (Figure 6E and F).

5. Exogenous HDL nanoparticles accumulate in mouse lungs after aerosolization

To further explore how rHDL may be taken up *in vivo*, we decided to evaluate the biodisponibility of our particles in mice. Each mice received 25 μ L of rHDL or His-rHDL (100 μ g) or PBS using intratracheal aerosolization.

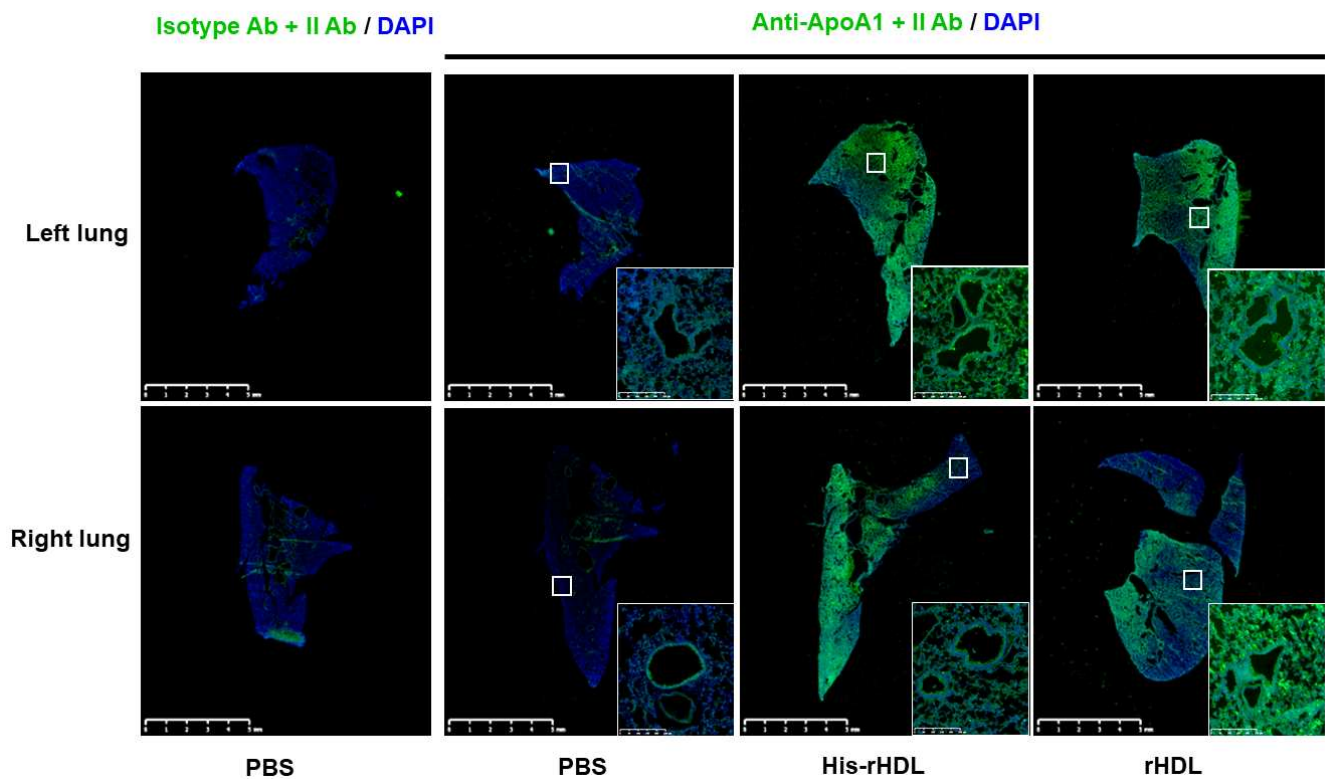


Figure 7. rHDLs are detectable in mouse lungs 6 hours after aerosolization. DAPI (blue) was used for nucleus staining. A rabbit anti human ApoA1 antibody and a donkey anti rabbit Alexa 488 antibody were used for labeling rHDL or His-rHDL (green) on mouse lung sections 6h after PBS solution aerosolization or 100 μ g (25 μ L) of rHDL aerosolization or 100 μ g (25 μ L) of His-rHDL aerosolization. Representative illustration of ApoA1 staining in both left and right lungs (from 1 experiment with n=7 mice). Scale bar =5 mm. High magnification images of the areas delimited by squares are also presented.

After 6 hours, mice were sacrificed and lungs were removed. Immunostaining against ApoA1 showed that both rHDL and His-rHDL were homogeneously distributed in mice lungs (Figures 7 and 8). These results suggest that nanoparticles are able to reach and fix the right and left lung in a similar manner.

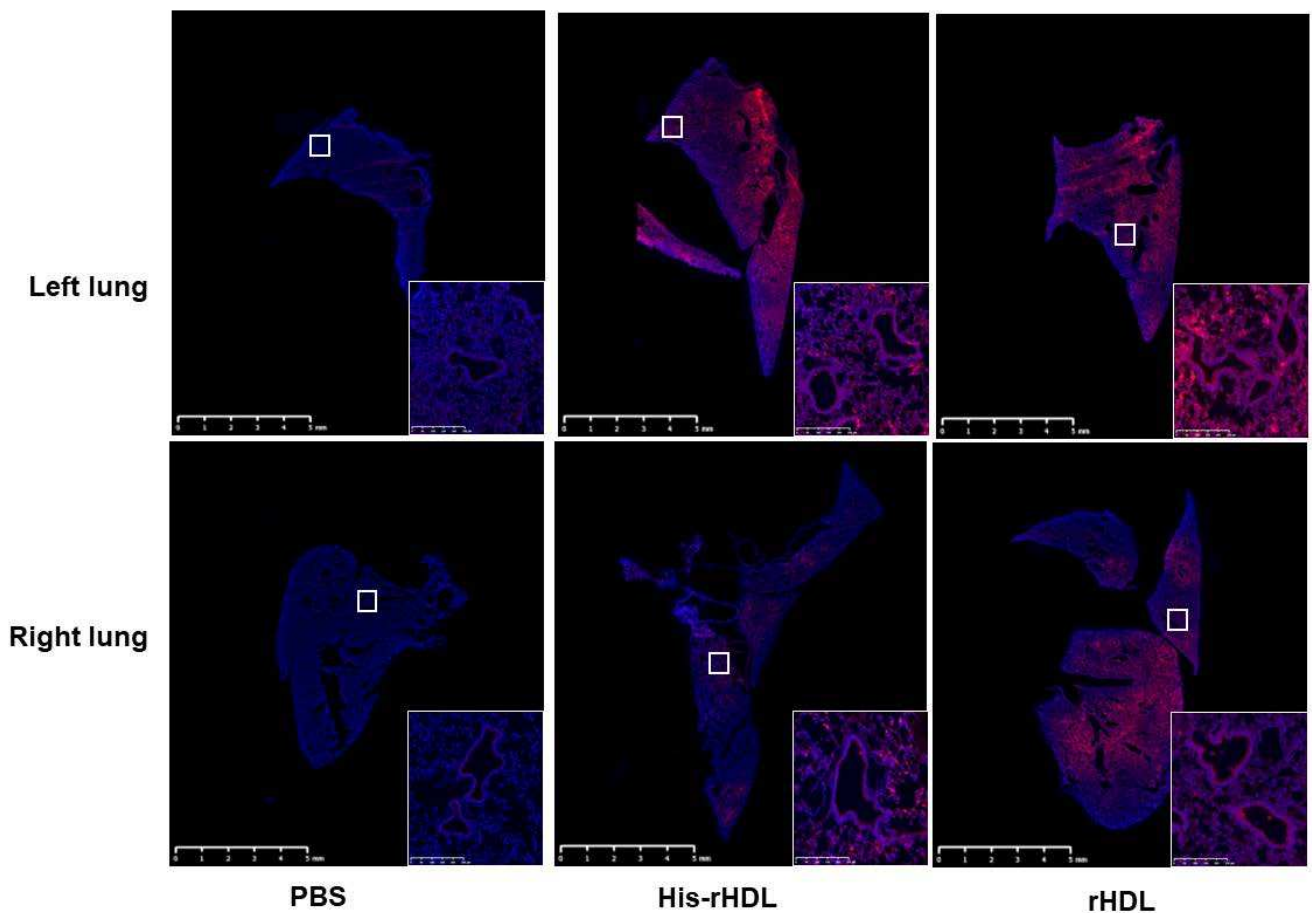


Figure 8. DiIc18 labeled rHDLs are detectable in mouse lung 6h after aerosolization.

DAPI (blue) was used for nucleus staining. Representative illustration DiIc18 labeled rHDLs (red) after PBS solution aerosolization or 100 μ g (25 μ L) of His-rHDL aerosolization or 100 μ g (25 μ L) of rHDL aerosolization. (from 1 experiment with n=7 mice). Scale bar =5 mm. High magnification images of the areas delimited by squares are also presented.

Discussion:

The therapeutic approach using HDL nanoparticles or HDL mimetics appears today as a promising strategy to limit pathological complications in inflammatory or infectious diseases. This strategy by supplementation of HDL, mainly through intravenous injection, aims to normalize the plasma concentration of HDL and their functional quality in these diseases and

ultimately improve the related-metabolic disorders [6]. Indeed, the pleiotropic properties of HDL confer them protective effects of antioxidant, anti-inflammatory, anti-thrombotic and also atheroprotective type [4]. In addition to these lipid transport functions that favorably participate in lipid homeostasis, HDL can serve as nanoparticles, drug or nucleic acids carriers [22, 23]. If the initial clinical investigations using endogenous HDL did not provide clear evidence of their efficacy and benefit [24], the possibility of using synthetic HDL has subsequently opened up interesting prospects. Indeed, the reconstitution of HDL nanoparticles allows to improve their properties by acting on the lipid composition or on the gain of function of ApoA1, which is the key protein in the structure as well as in the numerous intrinsic properties and metabolic functions of HDL [25, 26]. These synthetic HDLs, commonly termed ApoA1 nanoparticles or rHDLs, have been shown to mitigate inflammatory storms in certain infectious [16] or metabolic [13, 15] diseases when administered intravenously in some pilot studies.

Different strategies exist for the production of ApoA1, on the one hand in eukaryotic cells such as the Chinese hamster ovary (CHO) cell systems [27, 28] or the baculovirus-insect cell system [29], or on the other hand in prokaryotic cells with mainly *E. coli* bacteria for human ApoA1 expression [30, 31]. Since ApoA1 does not undergo post-translational modification such as glycosylation, the eukaryotic system is not required for the production of the mature protein. Therefore, expression of the protein in a bacterial system is more relevant as transfection is easier than in eukaryotic cells and the expression yield is higher [32]. In addition, it is important to use a contaminant-free protocol for the production of ApoA1 to avoid its degradation by the proteases of the bacterial strain [32].

In this study, we have produced, in a *Cleare coli* strain, recombinant human apolipoprotein A1 with or lacking a N-terminal extension containing a poly-histidine tag (6xHis). The protein is purified with a final yield of around 30 mg of protein per liter of culture medium, comparable to the other procedures used for the production of ApoA1 [29]. The advantage of using the *Cleare coli* strain instead of the *E. coli* strain is to obtain directly the endotoxin-free protein without going through an additional purification step that could affect the yield [33]. Moreover, the relevance of keeping the histidine tag has two advantages: first, it makes it easier to purify the protein by affinity chromatography using a nickel column and also enables the purification of ApoA1-containing nanoparticles (His-tagged ApoA1) following an enrichment with a therapeutic drug. In addition, ApoA1 nanoparticles with the poly histidine chain might be a potential carrier for delivery of miRNA mimics [34]. The main

drawback of preserving this label would be to affect biochemical and biological properties of the apolipoprotein and hence the nanoparticles. However, we showed by NMR that following the cleavage of the histidine tag by TEV protease, the structure of the protein is unmodified. Moreover, the tag does not appear to have a notable impact on the nanoparticle reconstitution.

Several protocols have previously been used for reconstituting nanoparticles from phospholipids and ApoA1, including sonication, thermal cycling, sodium cholate, and microfluidics [35]. Here, using a method that combined use of sodium cholate with freeze/thaw thermal cycling, we mainly reconstitute nanoparticles with a diameter of 7-8 nm after incubation with ApoA1 and POPC at a 1:75 molar ratio of protein to phospholipid. DLS, TEM and NMR results indicate that the method used allows ApoA1 to be complexed correctly with POPC and that the use of ApoA1 with a poly-histidine extension in the N-terminal position does not seem to affect the size of the nanoparticles with the used method.

As the functions of rHDL nanoparticles are closely related to their structural integrity [6] as well as that of ApoA1, some biological properties have been tested. Even though reverse cholesterol transport is considered as a key function of HDL as it constitutes a major atheroprotective event in lipid metabolism [36], our study focused more towards the anti-inflammatory activity and cellular uptake of nanoparticles known to be inherent properties of HDL. Our data revealed the ability of rHDL and His-rHDL to be rapidly internalized by endothelial and epithelial cells. The internalization of HDL by endothelial cells has already been shown to be mediated by scavenger receptor, class B, type I (SR-BI) [4], and, as described by Rohrer L et al, transcytosis appears to be one of the main mechanisms in which the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) is also involved [37]. HDL uptake can also occur via endocytosis involving tubular endosomal vesicles and multivesicular bodies in human endothelial cells [38].

HDL uptake by epithelial cells and the mechanisms involved are, on the other hand, less well documented, with notably contradictory results on the involvement of SR-BI in the regulation of endocytosis on Chinese Hamster Ovary epithelial cells (CHO) [39].

Similarly, the occurrence of the Tag on the apolipoprotein does not affect the anti-inflammatory and endothelial-protective properties of rHDL. We tested the ability of rHDL and His-rHDL to limit inflammation and endothelial activation induced by TNF α on immortalized human vascular endothelial cells (EA.hy926). Indeed, we found that both types

of ApoA1 nanoparticles equivalently inhibited IL-6 cytokine and intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in response to TNF α . As for the decrease in IL-6 mRNA levels and its secretion in TNF α -stimulated endothelial cells, the levels of protection appear similar to those found in another study using reconstituted plasma or HDL [40]. In addition, inhibition of ICAM-1 expression rHDL and His-HDL indicates a significant protective role of nanoparticles towards endothelial activation. This protection is particularly marked as, in another study, the levels of protection are equivalent solely due to the inclusion of at least 5% sphingomyelin in the rHDL lipid composition [41].

Numerous clinical studies suggest that HDL cholesterol is associated with lung function and pulmonary disorders [42, 43]. Notwithstanding such observations, pulmonary administration of HDL has never been explored. An *in vivo* biodistribution study of our HDL nanoparticles was therefore carried out on C57/BL6 mice using aerosolization. The presence of the N-terminal extension containing a poly-histidine tag did not alter the homogeneous biodistribution in the lung. According to image magnifications (Figure 7 and 8), it seems that both rHDL and His-rHDL can be detected in epithelial cells but also in the parenchyma. Further study will clarify which cell type can uptake rHDL/His-rHDL and how these nanoparticles cross the epithelium to eventually join the bloodstream for therapeutic action in peripheral tissues.

Taken together, these results demonstrate that human recombinant ApoA1 produced in *Clear coli* can be used to produce HDL nanoparticles and that poly-histidine tag do not alter their endothelial protective function.

Supplementary Materials: Figure S1: Schematic of the codon-optimized pet28a plasmid designed by GeneCust for bacterial transformation and overexpression of ApoA1. **Figure S2:** Protocol design of recombinant ApoA1 production and rHDL reconstitution. **Figure S3:** Two methods of purification of uncleaved rApoA1 by affinity chromatography. **Figure S4:** rApoA1 conformation is similar to plasma ApoA1 conformation in nanoparticles as evidenced by NMR. **Figure S5:** His-rHDL nanoparticles are taken up by EA.hy 926 endothelial cells. **Figure S6:** Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by EA.hy 926 cells. **Figure S7:** Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by bEnd.3 cells. **Figure S8:** Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by A549 cells. **Figure S9:** His-rHDL nanoparticles are taken up by A549 epithelial cells.

Author Contributions: S.R., M.L.A. and P.R. conceived, designed and performed the experiments; M.B and B.A. conceived and designed the animal experiments; S.R. and P.G. performed the recombinant ApoA1 production; J.C. performed RMN analysis; S.R., M.L.A. and P.R. analyzed the data; S.R., O.M., B.A. and P.R. writing original draft; S.R., J.C., O.M., B.A. and P.R. writing—review and editing; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université de La Réunion and by the European Regional Development Funds RE0001897 (EU, Région Réunion, French State national counterpart). SR and MLA were recipients of a fellowship grant from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Réunion University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Wilson, P. W., R. D. Abbott, and W. P. Castelli. "High Density Lipoprotein Cholesterol and Mortality. The Framingham Heart Study." *Arteriosclerosis* 8, no. 6 (1988): 737-41.
2. Gordon, D. J., J. L. Probstfield, R. J. Garrison, J. D. Neaton, W. P. Castelli, J. D. Knoke, D. R. Jacobs, Jr., S. Bangdiwala, and H. A. Tyroler. "High-Density Lipoprotein Cholesterol and Cardiovascular Disease. Four Prospective American Studies." *Circulation* 79, no. 1 (1989): 8-15.
3. Pownall, H. J., C. Rosales, B. K. Gillard, and A. M. Gotto, Jr. "High-Density Lipoproteins, Reverse Cholesterol Transport and Atherogenesis." *Nat Rev Cardiol* 18, no. 10 (2021): 712-23.
4. Tran-Dinh, A., D. Diallo, S. Delbosc, L. M. Varela-Perez, Q. B. Dang, B. Lapergue, E. Burillo, J. B. Michel, A. Levoye, J. L. Martin-Ventura, and O. Meilhac. "Hdl and Endothelial Protection." *Br J Pharmacol* 169, no. 3 (2013): 493-511.
5. Huang, J., D. Wang, L. H. Huang, and H. Huang. "Roles of Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Disease: A New Paradigm for Drug Discovery." *Int J Mol Sci* 21, no. 3 (2020).
6. Darabi, M., I. Guillas-Baudouin, W. Le Goff, M. J. Chapman, and A. Kontush. "Therapeutic Applications of Reconstituted Hdl: When Structure Meets Function." *Pharmacol Ther* 157 (2016): 28-42.
7. Gibson, C. M., J. J. P. Kastelein, A. T. Phillips, P. E. Aylward, M. K. Yee, M. Tendera, S. J. Nicholls, S. Pocock, S. G. Goodman, J. H. Alexander, A. M. Lincoff, C. Bode, D. Duffy, M. Heise, G. Berman, S. J. Mears, P. Tricoci, L. I. Deckelbaum, P. G. Steg, P. Ridker, and R. Mehran. "Rationale and Design of ApoA1 Event Reducing in Ischemic Syndromes Ii (Aegis-Ii): A Phase 3, Multicenter, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel-Group Study to Investigate the Efficacy and Safety of Csl112 in Subjects after Acute Myocardial Infarction." *Am Heart J* 231 (2021): 121-27.
8. Lapergue, B., B. Q. Dang, J. P. Desilles, G. Ortiz-Munoz, S. Delbosc, S. Loyau, L. Louedec, P. O. Couraud, M. Mazighi, J. B. Michel, O. Meilhac, and P. Amarenco. "High-Density Lipoprotein-Based Therapy Reduces the Hemorrhagic Complications Associated with Tissue Plasminogen Activator Treatment in Experimental Stroke." *Stroke* 44, no. 3 (2013): 699-707.
9. Lapergue, B., J. A. Moreno, B. Q. Dang, M. Coutard, S. Delbosc, G. Raphaeli, N. Auge, I. Klein, M. Mazighi, J. B. Michel, P. Amarenco, and O. Meilhac. "Protective Effect of High-Density Lipoprotein-Based Therapy in a Model of Embolic Stroke." *Stroke* 41, no. 7 (2010): 1536-42.
10. Morin, E. E., L. Guo, A. Schwendeman, and X. A. Li. "Hdl in Sepsis - Risk Factor and Therapeutic Approach." *Front Pharmacol* 6 (2015): 244.
11. Guo, L., J. Ai, Z. Zheng, D. A. Howatt, A. Daugherty, B. Huang, and X. A. Li. "High Density Lipoprotein Protects against Polymicrobe-Induced Sepsis in Mice." *J Biol Chem* 288, no. 25 (2013): 17947-53.

12. Levine, D. M., T. S. Parker, T. M. Donnelly, A. Walsh, and A. L. Rubin. "In Vivo Protection against Endotoxin by Plasma High Density Lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 24 (1993): 12040-4.
13. Krause, B. R., and A. T. Remaley. "Reconstituted Hdl for the Acute Treatment of Acute Coronary Syndrome." *Curr Opin Lipidol* 24, no. 6 (2013): 480-6.
14. Nanjee, M. N., J. E. Doran, P. G. Lerch, and N. E. Miller. "Acute Effects of Intravenous Infusion of ApoA1/Phosphatidylcholine Discs on Plasma Lipoproteins in Humans." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, no. 4 (1999): 979-89.
15. Tardif, J. C., J. Gregoire, P. L. L'Allier, R. Ibrahim, J. Lesperance, T. M. Heinonen, S. Kouz, C. Berry, R. Basser, M. A. Lavoie, M. C. Guertin, J. Rodes-Cabau, H. D. L. o. A.-S. Effect of r, and I. Efficacy. "Effects of Reconstituted High-Density Lipoprotein Infusions on Coronary Atherosclerosis: A Randomized Controlled Trial." *JAMA* 297, no. 15 (2007): 1675-82.
16. Tanaka, S., F. Begue, B. Veeren, A. Tran-Dinh, T. Robert, P. Tashk, B. Lortat-Jacob, D. Faille, L. de Chaisemartin, N. Zappella, E. Atchade, L. Kramer, P. Montravers, and O. Meilhac. "First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe Icu Covid-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation." *Biomedicines* 10, no. 4 (2022).
17. Faguer, S., A. Del Bello, C. Danet, Y. Renaudineau, J. Izopet, and N. Kamar. "Apolipoprotein-a-I for Severe Covid-19-Induced Hyperinflammatory States: A Prospective Case Study." *Front Pharmacol* 13 (2022): 936659.
18. Green, M. R., and J. Sambrook. "The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent Escherichia Coli: "Ultracompetent" Cells." *Cold Spring Harb Protoc* 2020, no. 6 (2020): 101196.
19. Matz, C. E., and A. Jonas. "Micellar Complexes of Human Apolipoprotein a-I with Phosphatidylcholines and Cholesterol Prepared from Cholate-Lipid Dispersions." *J Biol Chem* 257, no. 8 (1982): 4535-40.
20. Repetto, G., A. del Peso, and J. L. Zurita. "Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity." *Nat Protoc* 3, no. 7 (2008): 1125-31.
21. Revelli, D. A., J. A. Boylan, and F. C. Gherardini. "A Non-Invasive Intratracheal Inoculation Method for the Study of Pulmonary Melioidosis." *Front Cell Infect Microbiol* 2 (2012): 164.
22. Lacko, A. G., N. A. Sabnis, B. Nagarajan, and W. J. McConathy. "Hdl as a Drug and Nucleic Acid Delivery Vehicle." *Front Pharmacol* 6 (2015): 247.
23. Mutharasan, R. K., L. Foit, and C. S. Thaxton. "High-Density Lipoproteins for Therapeutic Delivery Systems." *J Mater Chem B* 4, no. 2 (2016): 188-97.
24. Ray, K. K., S. J. Nicholls, K. A. Buhr, H. N. Ginsberg, J. O. Johansson, K. Kalantar-Zadeh, E. Kulikowski, P. P. Toth, N. Wong, M. Sweeney, G. G. Schwartz, B. E. Investigators, and Committees. "Effect of Apabetalone Added to Standard Therapy on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients with Recent Acute Coronary Syndrome and Type 2 Diabetes: A Randomized Clinical Trial." *JAMA* 323, no. 16 (2020): 1565-73.
25. Puranik, R., S. Bao, E. Nobecourt, S. J. Nicholls, G. J. Dasting, P. J. Barter, D. S. Celermajer, and K. A. Rye. "Low Dose Apolipoprotein a-I Rescues Carotid Arteries from Inflammation in Vivo." *Atherosclerosis* 196, no. 1 (2008): 240-47.
26. Frank, P. G., and Y. L. Marcel. "Apolipoprotein a-I: Structure-Function Relationships." *J Lipid Res* 41, no. 6 (2000): 853-72.
27. Mallory, J. B., P. J. Kushner, A. A. Protter, C. L. Cofer, V. L. Appleby, K. Lau, J. W. Schilling, and J. L. Vigne. "Expression and Characterization of Human Apolipoprotein a-I in Chinese Hamster Ovary Cells." *J Biol Chem* 262, no. 9 (1987): 4241-7.

28. Forte, T. M., M. R. McCall, S. Amacher, R. W. Nordhausen, J. L. Vigne, and J. B. Mallory. "Physical and Chemical Characteristics of Apolipoprotein a-I-Lipid Complexes Produced by Chinese Hamster Ovary Cells Transfected with the Human Apolipoprotein a-I Gene." *Biochim Biophys Acta* 1047, no. 1 (1990): 11-8.
29. Sorci-Thomas, M. G., J. S. Parks, M. W. Kearns, G. N. Pate, C. Zhang, and M. J. Thomas. "High Level Secretion of Wild-Type and Mutant Forms of Human ProApoA1 Using Baculovirus-Mediated Sf-9 Cell Expression." *J Lipid Res* 37, no. 3 (1996): 673-83.
30. Tricerri, M. A., A. K. Behling Agree, S. A. Sanchez, J. Bronski, and A. Jonas. "Arrangement of Apolipoprotein a-I in Reconstituted High-Density Lipoprotein Disks: An Alternative Model Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Experiments." *Biochemistry* 40, no. 16 (2001): 5065-74.
31. Bergeron, J., P. G. Frank, F. Emmanuel, M. Latta, Y. Zhao, D. L. Sparks, E. Rassart, P. Deneffe, and Y. L. Marcel. "Characterization of Human Apolipoprotein a-I Expressed in Escherichia Coli." *Biochim Biophys Acta* 1344, no. 2 (1997): 139-52.
32. Panagotopulos, S. E., S. R. Witting, E. M. Horace, J. Nicholas Maiorano, and W. Sean Davidson. "Bacterial Expression and Characterization of Mature Apolipoprotein a-I." *Protein Expr Purif* 25, no. 2 (2002): 353-61.
33. Cardoso, V. M., S. A. H. Paredes, G. Campani, V. M. Goncalves, and T. C. Zangirolami. "Clearcoli as a Platform for Untagged Pneumococcal Surface Protein a Production: Cultivation Strategy, Bioreactor Culture, and Purification." *Appl Microbiol Biotechnol* 106, no. 3 (2022): 1011-29.
34. Kasina, V., A. Wahane, C. H. Liu, L. Yang, M. P. Nieh, F. J. Slack, and R. Bahal. "Next-Generation Poly-L-Histidine Formulations for Mirna Mimic Delivery." *Mol Ther Methods Clin Dev* 29 (2023): 271-83.
35. Kuai, R., D. Li, Y. E. Chen, J. J. Moon, and A. Schwendeman. "High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles." *ACS Nano* 10, no. 3 (2016): 3015-41.
36. Jebari-Benslaiman, S., K. B. Uribe, A. Benito-Vicente, U. Galicia-Garcia, A. Larrea-Sebal, I. Alloza, K. Vandenbroeck, H. Ostolaza, and C. Martin. "Cholesterol Efflux Efficiency of Reconstituted Hdl Is Affected by Nanoparticle Lipid Composition." *Biomedicines* 8, no. 10 (2020).
37. Rohrer, L., P. M. Ohnsorg, M. Lehner, F. Landolt, F. Rinninger, and A. von Eckardstein. "High-Density Lipoprotein Transport through Aortic Endothelial Cells Involves Scavenger Receptor Bi and Atp-Binding Cassette Transporter G1." *Circ Res* 104, no. 10 (2009): 1142-50.
38. Fruhwurth, S., M. Pavelka, R. Bittman, W. J. Kovacs, K. M. Walter, C. Rohrl, and H. Stangl. "High-Density Lipoprotein Endocytosis in Endothelial Cells." *World J Biol Chem* 4, no. 4 (2013): 131-40.
39. Fung, K. Y. Y., G. D. Fairn, and W. L. Lee. "Transcellular Vesicular Transport in Epithelial and Endothelial Cells: Challenges and Opportunities." *Traffic* 19, no. 1 (2018): 5-18.
40. Gomaschi, M., N. Basilico, F. Sisto, D. Taramelli, S. Eligini, S. Colli, C. R. Sirtori, G. Franceschini, and L. Calabresi. "High-Density Lipoproteins Attenuate Interleukin-6 Production in Endothelial Cells Exposed to Pro-Inflammatory Stimuli." *Biochim Biophys Acta* 1736, no. 2 (2005): 136-43.
41. Munoz-Vega, M., F. Masso, A. Paez, G. Vargas-Alarcon, R. Coral-Vazquez, J. Mas-Oliva, E. Carreon-Torres, and O. Perez-Mendez. "Hdl-Mediated Lipid Influx to Endothelial Cells Contributes to Regulating Intercellular Adhesion Molecule (Icam)-1 Expression and Enos Phosphorylation." *Int J Mol Sci* 19, no. 11 (2018).

42. Burkart, K. M., A. Manichaikul, J. B. Wilk, F. S. Ahmed, G. L. Burke, P. Enright, N. N. Hansel, D. Haynes, S. R. Heckbert, E. A. Hoffman, J. D. Kaufman, J. Kurai, L. Loefer, S. J. London, Y. Meng, G. T. O'Connor, E. Oelsner, M. Petrini, T. D. Pottinger, C. A. Powell, S. Redline, J. I. Rotter, L. J. Smith, M. Soler Artigas, M. D. Tobin, M. Y. Tsai, K. Watson, W. White, T. R. Young, S. S. Rich, and R. G. Barr. "Apom and High-Density Lipoprotein Cholesterol Are Associated with Lung Function and Per Cent Emphysema." *Eur Respir J* 43, no. 4 (2014): 1003-17.
43. Park, J. H., S. Mun, D. P. Choi, J. Y. Lee, and H. C. Kim. "Association between High-Density Lipoprotein Cholesterol Level and Pulmonary Function in Healthy Korean Adolescents: The Js High School Study." *BMC Pulm Med* 17, no. 1 (2017): 190.

Supplementary Data

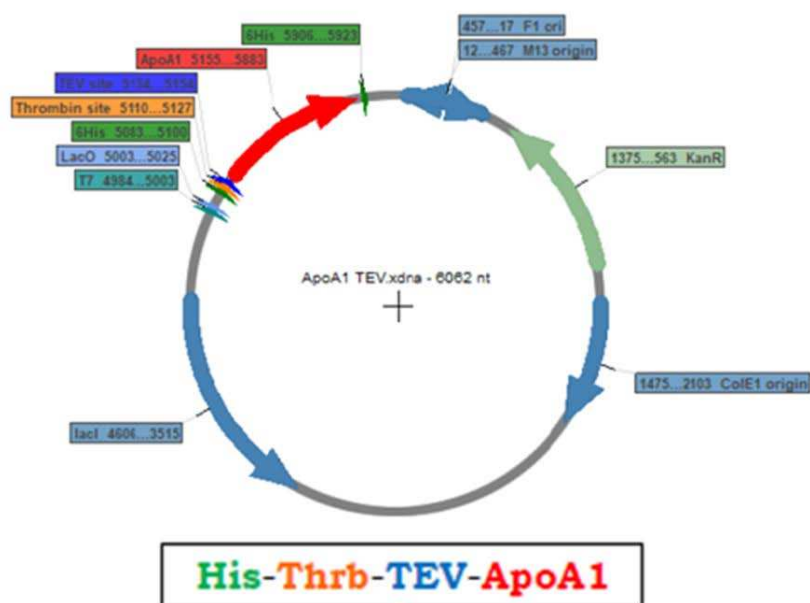


Figure S1: Schematic of the codon-optimized pet28a plasmid designed by GeneCust for bacterial transformation and overexpression of ApoA1

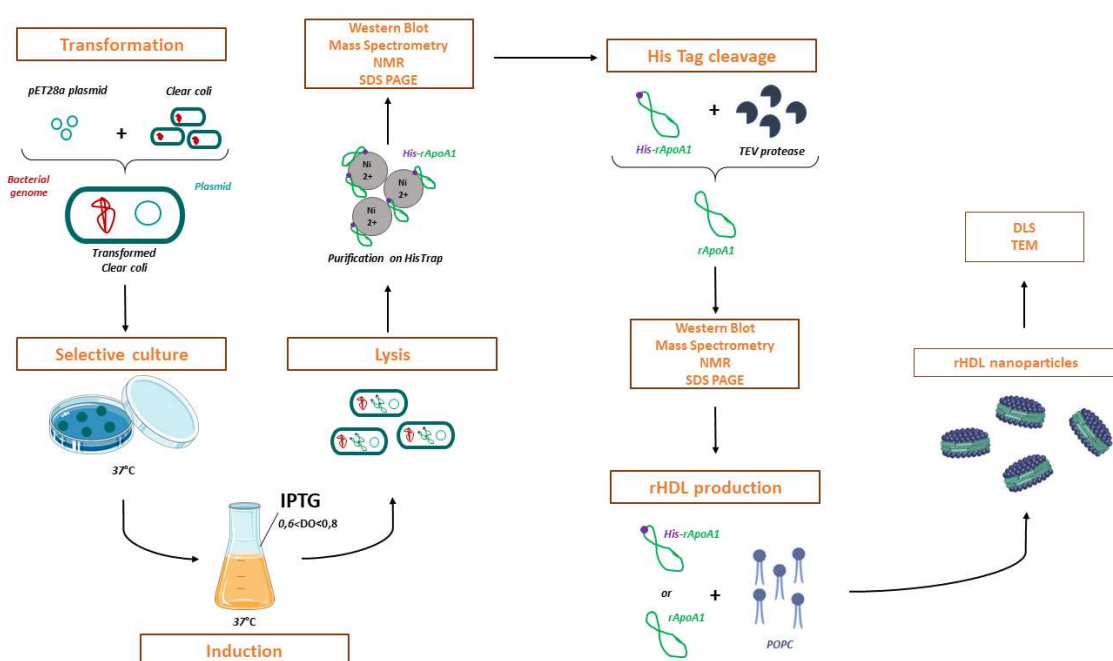


Figure S2: Protocol design of recombinant ApoA1 production and rHDL reconstitution

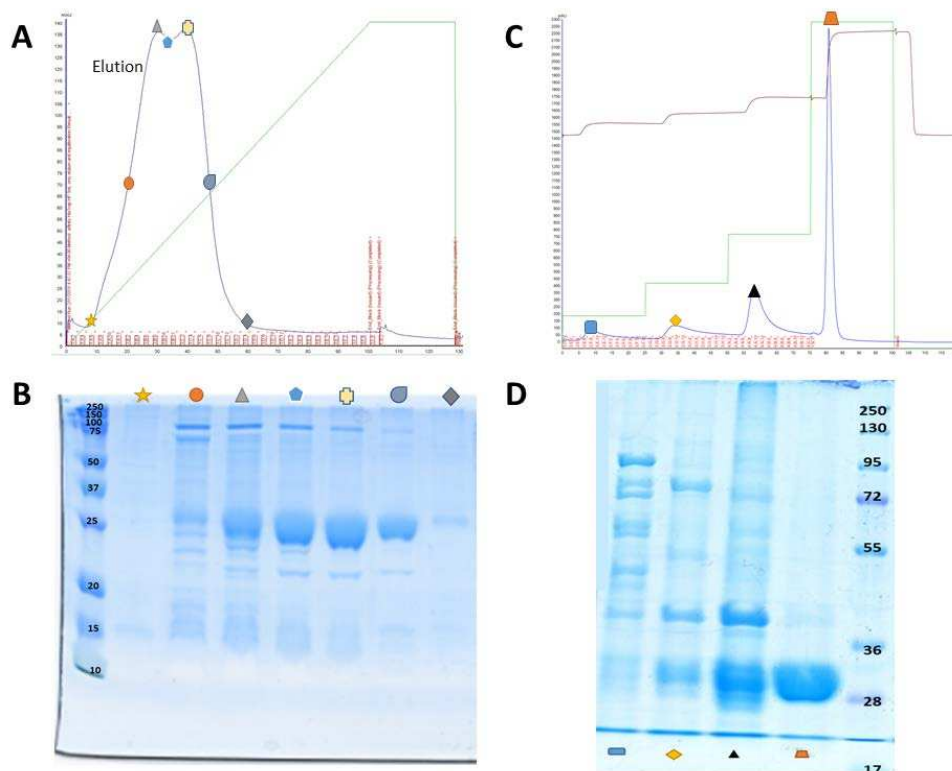


Figure S3: Two methods of purification of uncleaved rApoA1 by affinity chromatography. A). Elution profile (OD280) in blue curve and imidazole gradient in green curve. B) SDS PAGE gel stained with Coomassie blue of different purification fractions. Left Lane : molecular weight marker, colored forms correspond to the fraction of the elution peak. C) Elution profile (OD280) in blue curve and different levels of imidazole in green curve. D) SDS PAGE gel stained with Coomassie blue of different purification fractions. Right Lane : molecular weight marker, colored forms correspond to the fraction of the elution peak.

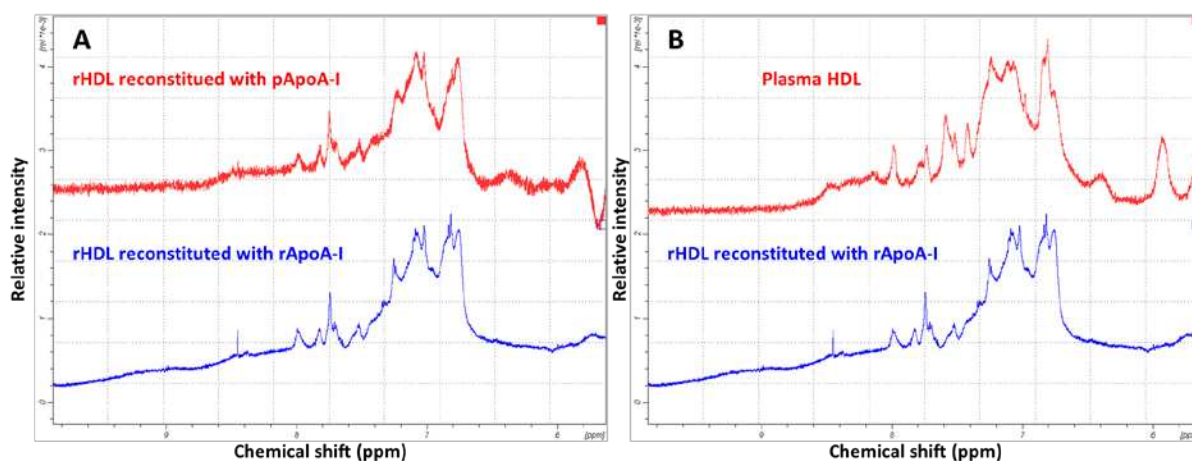


Figure S4: rApoA1 conformation is similar to plasma ApoA1 conformation in nanoparticles as evidenced by NMR. 1D ^1H NMR spectra overlay in the amide region of rHDL reconstituted with cleaved recombinant ApoA1 (rApoA1) in blue and A) rHDL reconstituted with plasma ApoA1 (pApoA1) or B) purified plasma HDL in red. All spectra were recorded at pH=8 and 37°C. The high similarity of the spectra indicates that rApoA1 structure is almost identical to that of pApoA1 in reconstituted HDL (A) and also similar to that of pApoA1 in plasma HDL (B)

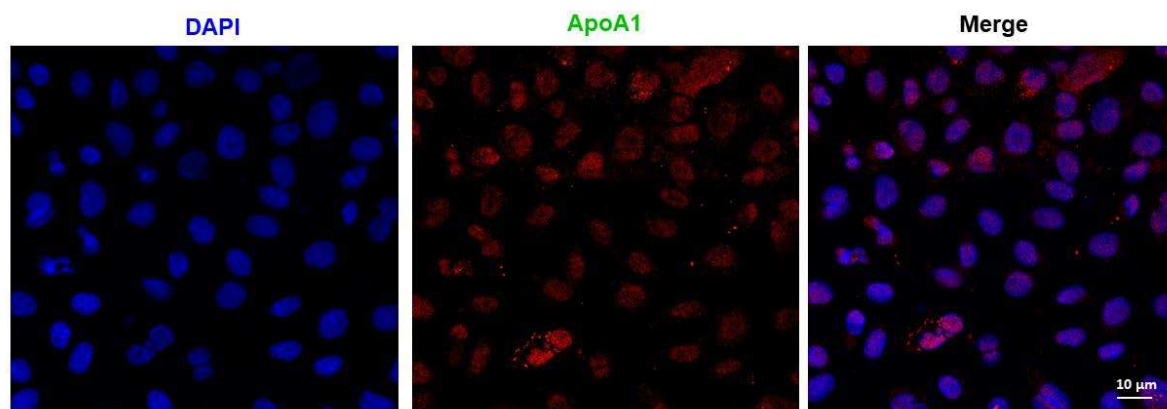


Figure S5: His-rHDL nanoparticles are taken up by EA.hy 926 endothelial cells. Confocal imaging analysis of EA.hy926 after 6 h incubation with 0.4 mg/mL of His-rHDL. Rabbit anti human ApoA1 antibody was used for labelling rHDL (green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Confocal microscopy Scale bar = 10 μ m.

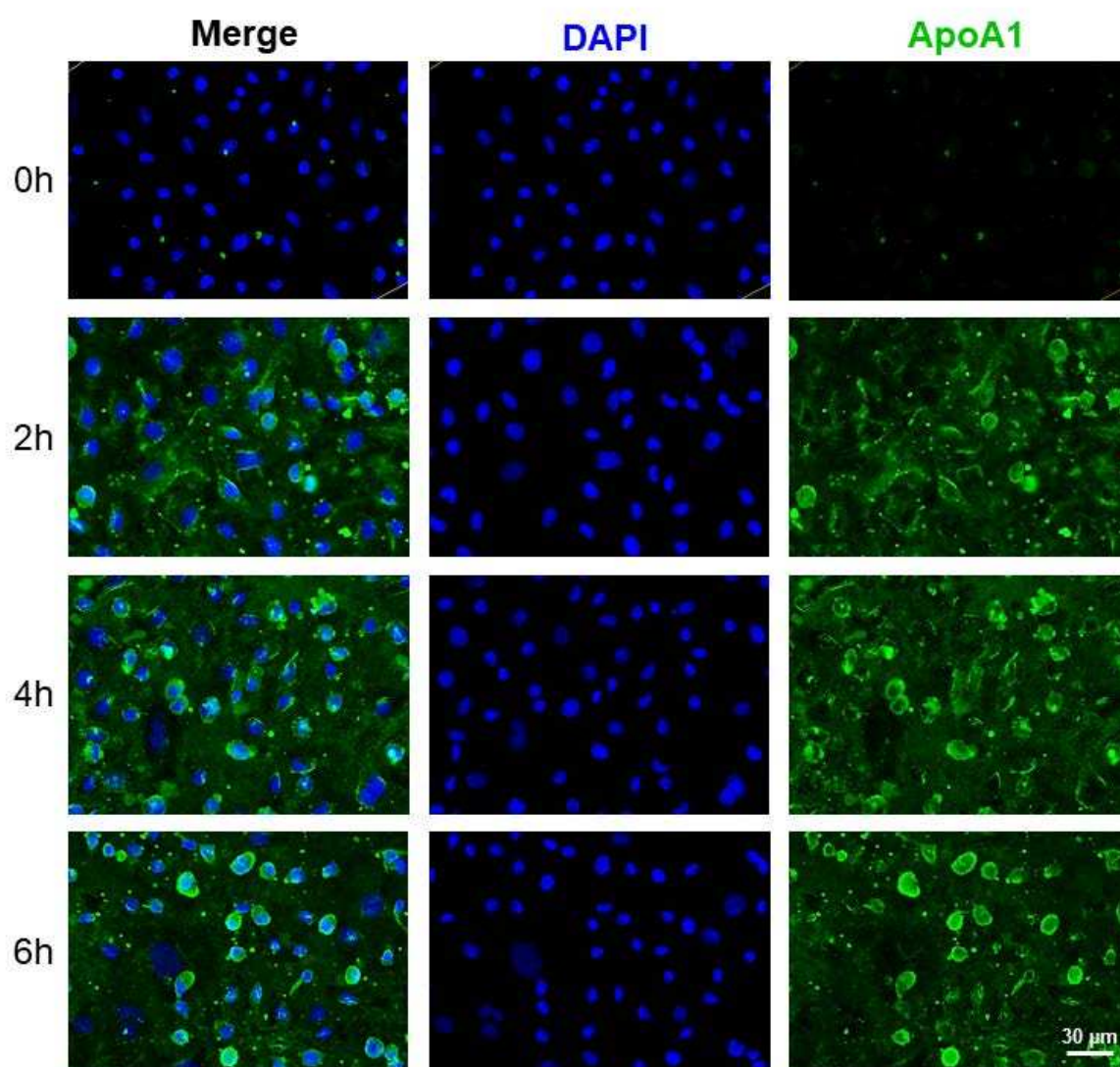


Figure S6. Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by EA.hy 926 cells. A) Immunostaining of EA.hy926 cells after incubation without and with 0.4 mg/mL of rHDL for 2 h, 4 h, and 6 h. Rabbit anti human ApoA1 was used for labelling rHDL (in green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μ m.

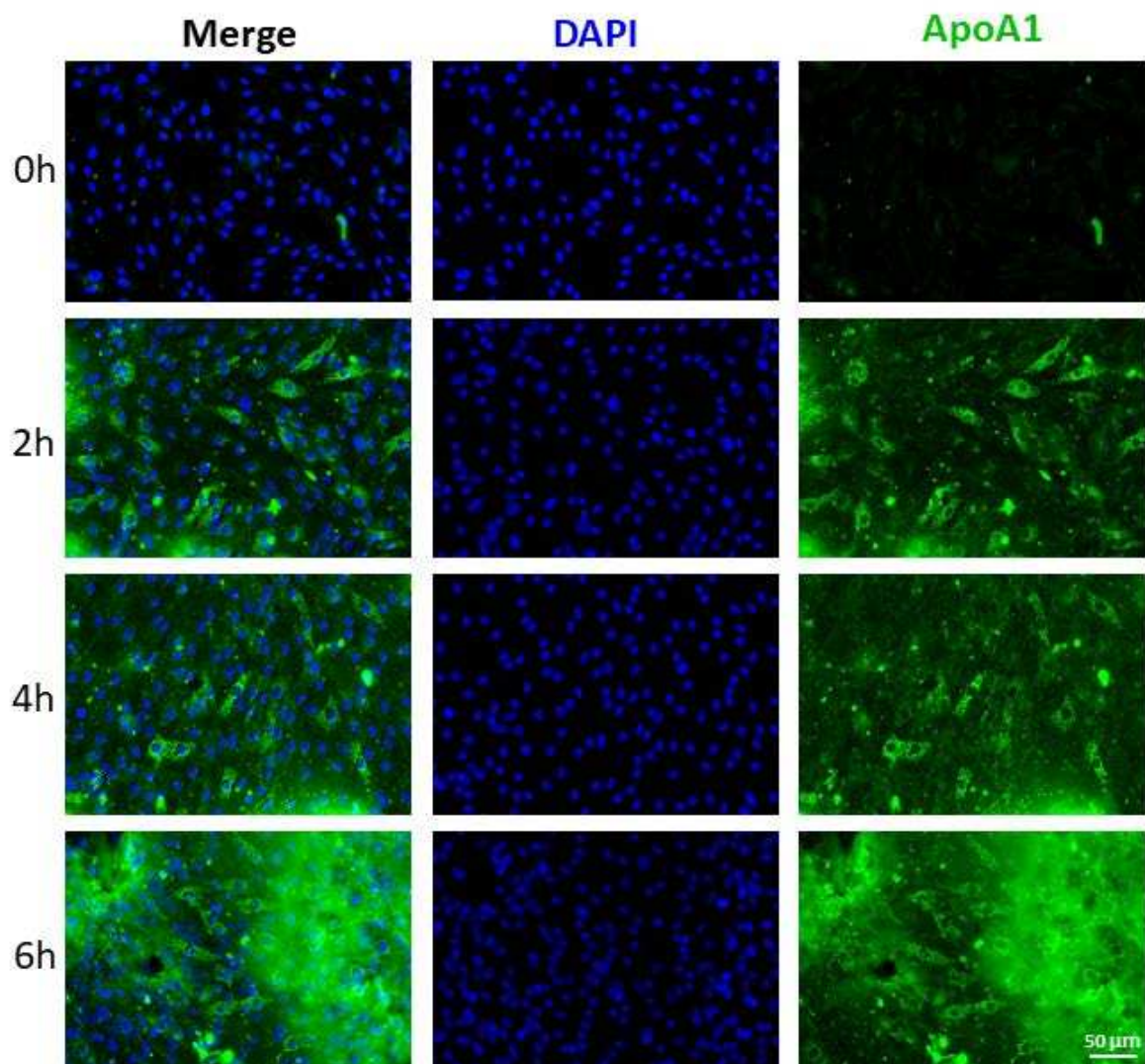


Figure S7. Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by bEnd.3 cells. Immunostaining of endothelial bEnd.3 cells after incubation without and with 0.4 mg/mL of rHDL for 2 h, 4 h, and 6 h. Rabbit anti human ApoA1 was used for labelling rHDL (in green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 50 μ m.

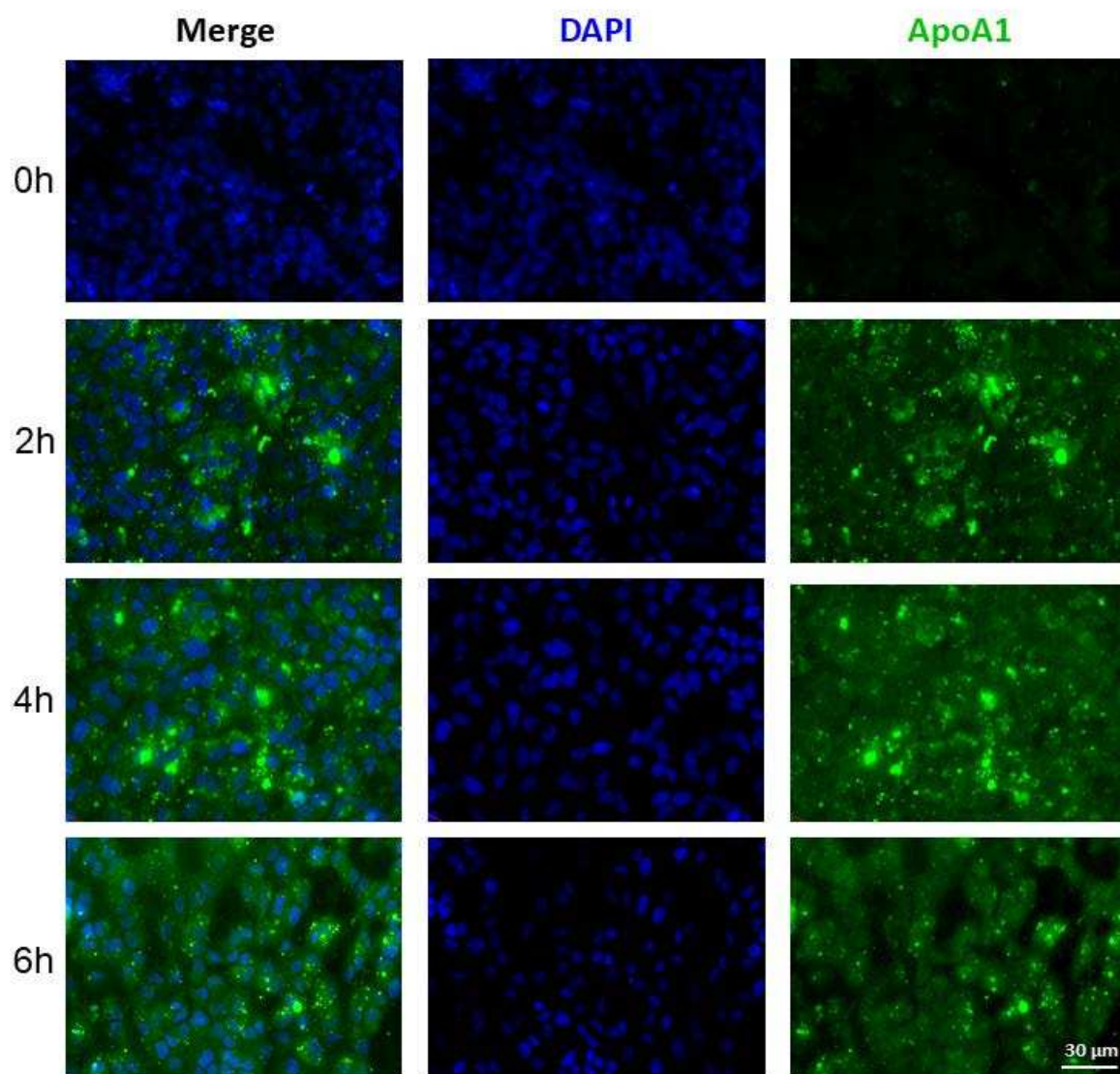


Figure S8. Kinetic of rHDL nanoparticles taken up by A549 cells. A) Immunostaining of epithelial A549 cells after incubation without and with 0.4 mg/mL of rHDL for 2 h, 4 h, and 6 h. Rabbit anti human ApoA1 was used for labelling rHDL (in green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μ m.

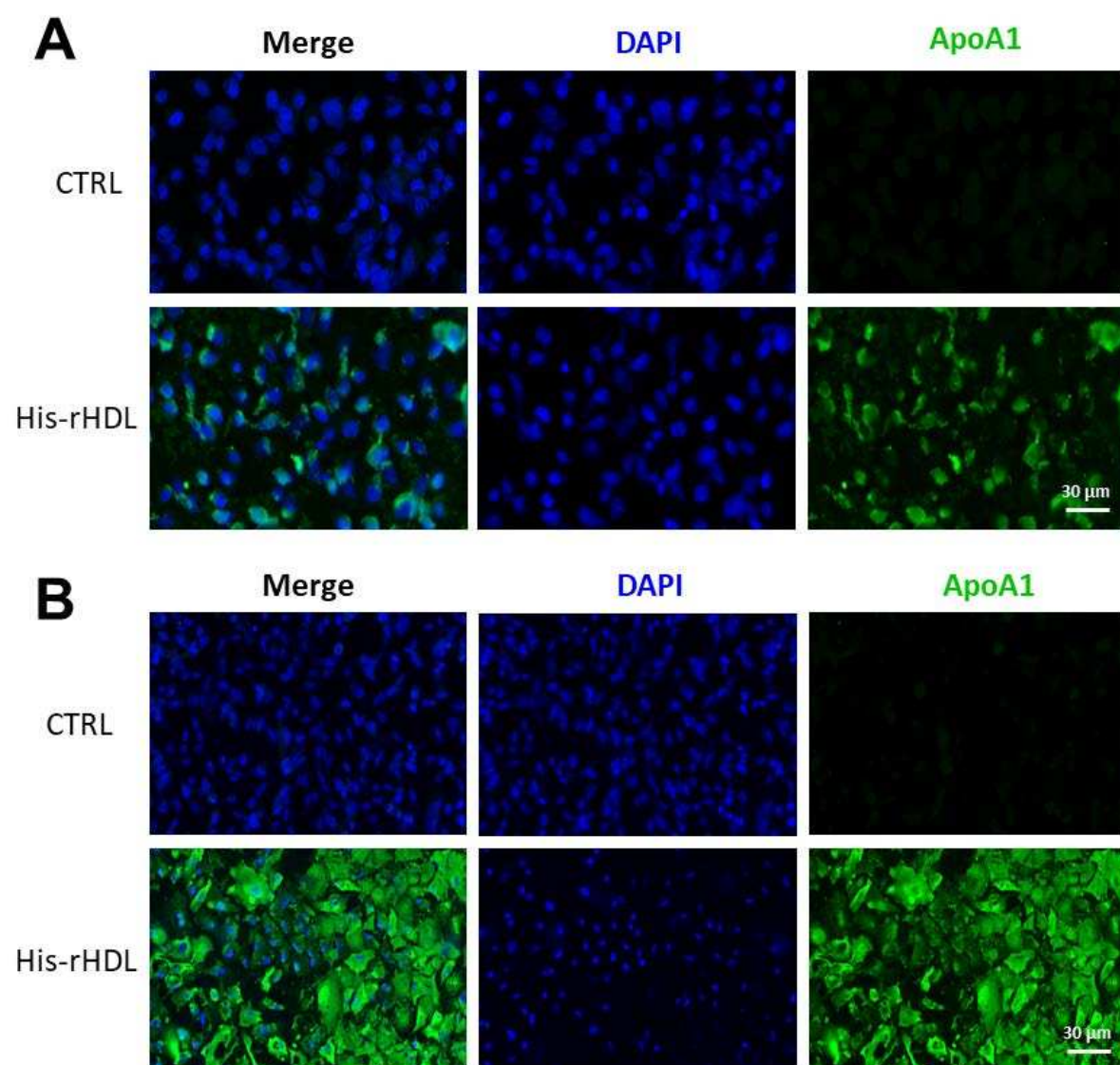


Figure S9: His-rHDL nanoparticles are taken up by A549 epithelial cells. Immunostaining of epithelial A549 cells after incubation without and with 0.4 mg/mL of rHDL for (A) 6h and (B) 20h. Rabbit anti human ApoA1 Ab was used for labelling rHDL (green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 30 μm .

1. Expérimentation préliminaire au test de biodisponibilité avec du (DiIC18)-CSL-111 chez la souris

Préalablement à l'administration des rHDL par aérosolisation pulmonaire, dont les résultats ont été présentés dans l'article précédent, nous avons effectué une étude préliminaire sur six souris C57BL/6 en administrant des rHDL CSL-111 par instillation dans la voie nasale afin de valider cette voie d'administration.

Protocole expérimental :

Des souris C57BL/6 âgées de sept semaines (n = 6) ont été nourries *ad libitum* avec de la nourriture de laboratoire standard et de l'eau. Toutes les souris ont été anesthésiées par kétamine intrapéritonéale (i.p.) (2,5 mg/kg) et par inhalation d'isoflurane. Pour l'instillation intranasale, la souris a été placée sur un plateau légèrement incliné et 10 µL de la solution de CSL-111 marqué au DiIC18 (1,7 mg/mL) ont été administrés à trois reprises directement dans la cavité intranasale à l'aide d'une pipette. Les souris contrôles ont quant à elles reçu 30 µL de solution PBS. Environ 6 heures après l'instillation, les souris ont été sacrifiées par exsanguination après anesthésie à l'isoflurane. Parmi les 6 souris, 2 ont reçu du PBS (#C1 et #C2) et 4 ont reçu la solution de CSL-111 marquée au DiIC18 (#H1, #H2, #H3 et #H4) (Figure 54).

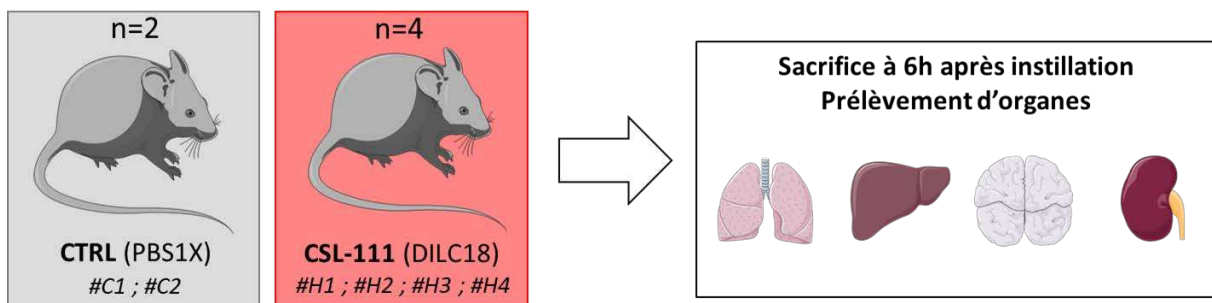


Figure 54 : Schéma expérimental du test de biodisponibilité préliminaire avec le CSL-111

Résultats :

Les images des coupes de poumons (Figure 55 A) montrent la présence de marquage fluorescent intense correspondant au DiIC18 dans les poumons (#H1, #H2 et #H4) des souris ayant reçu le CSL-111. Ce marquage apparaît moins intense pour la souris #H3 comparé aux autres. Les souris contrôles qui ont reçu uniquement du PBS ne présentent aucun marquage au niveau des poumons. Par ailleurs, les coupes effectuées sur les autres organes prélevés n'ont montré aucun marquage rouge correspondant à la présence de CSL-111. Ce résultat suggère qu'après 6 h, les particules de CSL-111 n'ont pas encore atteint d'autres organes mais que l'administration par instillation des nanoparticules de CSL-111 permet de cibler directement les poumons.

Afin de confirmer la présence des particules CSL-111 au niveau des poumons, un Western Blot de détection de l'ApoA-I est effectué sur des homogénats protéiques des poumons des différentes souris. L'analyse des résultats montre la présence d'ApoA-I humaine dans les homogénats de poumon des quatre souris qui ont reçu le CSL-111 (Figure 55 B). Ces résultats sont en cohérence avec ce que nous avons observé sur les coupes histologiques. En effet, l'intensité de la bande correspondant à l'ApoA-I pour la souris #H3 apparaît moins intense par rapport aux autres souris. De plus, l'absence de cette bande dans les homogénats des poumons des souris contrôles #C1 et #C2 confirme la spécificité de l'anticorps pour la forme humaine de l'ApoA-I.

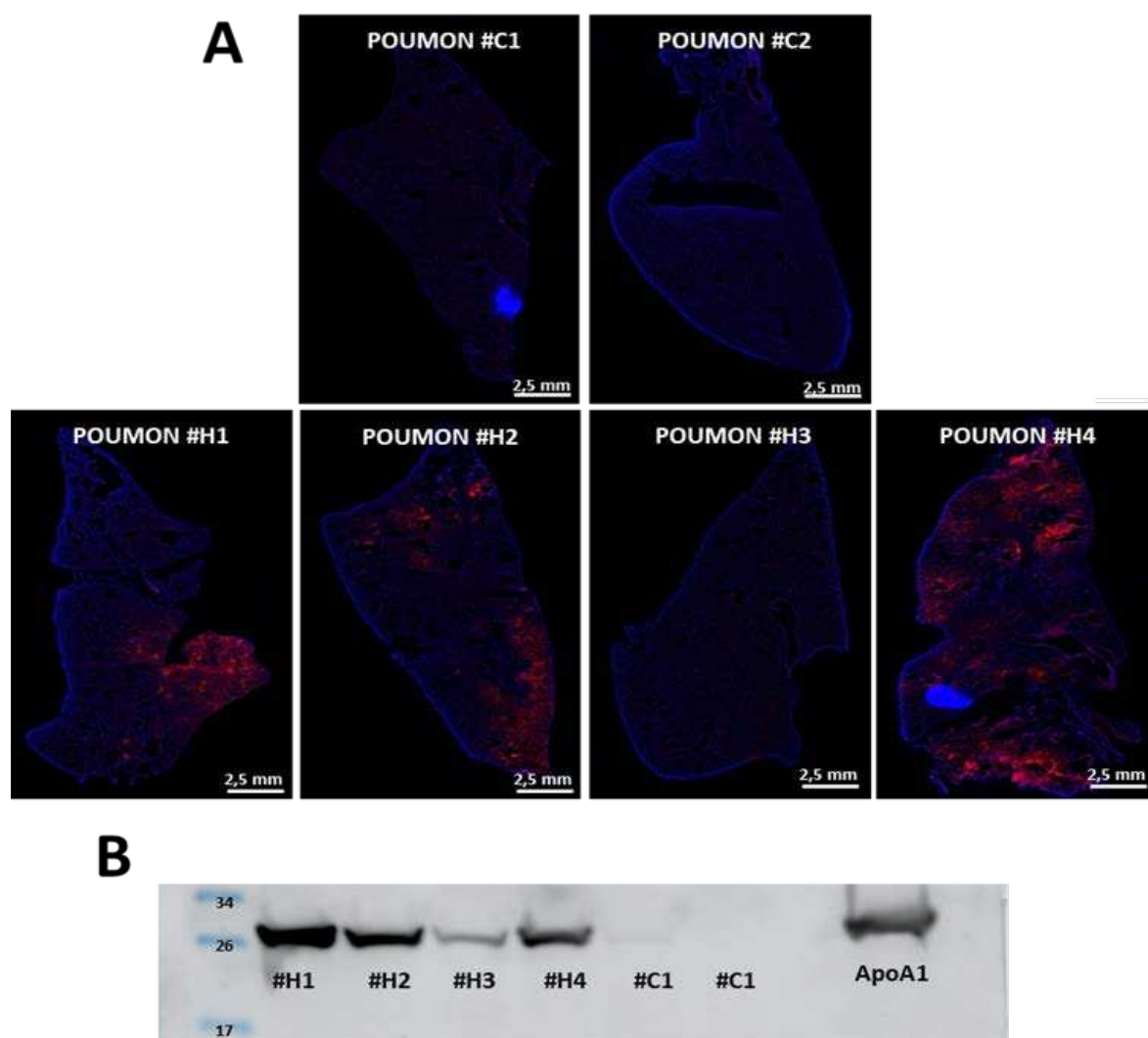


Figure 55 : Les HDL marquées au Dil-C18 sont détectables dans les poumons de souris 6 heures après l'instillation. A) Colorations représentatives au DAPI (bleu) et au DilC18 (rouge) sur des coupes de poumon de souris 6 h après instillation de 50 μ g (30 μ L) de CSL-111 marqués au DilC18 (#H1, #H2, #H3, #H4) ou après instillation d'une solution de PBS (#C1 et #C2). Les images des coupes de poumons ont été obtenues par microscopie à fluorescence après coloration des noyaux au DAPI. Barre d'échelle = 2,5 mm. B) Analyse par Western Blot de l'ApoA-I des homogénats protéiques des poumons à l'aide d'un anticorps de lapin dirigé contre ApoA-I humaine.

IV. Discussion

Dans cette première partie nous avons pu mettre en place des conditions expérimentales pour la production d'ApoA-I recombinante chez la bactérie *Clear coli* mais également pour la reconstitution homogène et reproductible de nanoparticules de rHDL.

La reconstitution de nanoparticules de rHDL nécessitant de l'ApoA-I ainsi que des phospholipides, nous avons la possibilité d'utiliser de l'ApoA-I purifiée directement à partir du plasma ou une forme recombinante issus d'une production au sein d'un plasmide. La méthode conventionnelle utilisée pour obtenir des HDL et de l'ApoA-I consiste à les isoler directement à partir du plasma humain par des étapes successives d'ultracentrifugation, de délipidation, suivie par l'élimination des virus et la pasteurisation (P. G. Lerch et al., 1996; Feng et al., 2006; Henderson et al., 2016; G. et al., 2018). Cependant, cette méthode d'isolement présente les inconvénients d'être longue et compliquée avec des rendements en ApoA-I ou en HDL relativement faibles dans la mesure où elle nécessite l'utilisation de très grands volumes de plasma (Feng et al., 2006; Ikon et al., 2017; G. et al., 2018). C'est pour ces raisons que de nombreuses méthodes de production de l'ApoA-I recombinante ont été mises en place dans différents systèmes d'expression, que cela soit les bactéries, les lignées cellulaires de mammifères, les levures ou encore les systèmes de cellules utilisant le baculovirus comme vecteur d'expression. Chacun de ces systèmes présente ses propres avantages et ses inconvénients. Par exemple, l'expression de l'ApoA-I recombinante produite au sein des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) présente l'avantage d'utiliser les cellules mammifères comme système de production permettant ainsi d'obtenir une protéine mature sans contamination par des endotoxines. Cependant, de très faibles rendements sont obtenus (30 µg/mL) avec ce système d'expression (H. H.-J. Schmidt et al., 1997). Feng et al. ainsi que Janakiraman et al. ont utilisé une levure, *Pichia pastoris*, pour la production de rApoA-I avec un rendement de 58 mg/L (Feng et al., 2006; Narasimhan Janakiraman et al., 2016). Des baculovirus, qui sont des virus sous forme de bâtonnets, sont également utilisés pour la production de l'ApoA-I recombinante. Ils ont pour avantage d'introduire facilement le gène codant pour la protéine d'intérêt dans les cellules d'insectes. Un rendement de 40 à 50 mg/L a été obtenu pour l'expression dans les baculovirus (Sorci-Thomas et al., 1996). Étant donné que l'ApoA-I ne nécessite pas de modifications post-traductionnelles, le système d'expression bactérien représente un organisme privilégié pour la production de cette protéine (Ryan et al., 2003). Ryan et al. ont utilisé la souche BL21(DE3) de *E. coli* pour exprimer l'ApoA-I recombinante fusionnée à une étiquette histidine avec une induction par de l'IPTG (Ryan et al., 2003). Ikon et al. ont également utilisé *E. coli* pour exprimer une ApoA-I recombinante sans étiquette (Ikon et al., 2017). Cependant, ce système bactérien présente l'inconvénient d'avoir une instabilité de l'ARNm natif de l'ApoA-I et de dégrader rapidement

l'apolipoprotéine A-I mature (Isacchi et al., 1989). D'autres inconvénients liés à l'utilisation de cette souche bactérienne sont la contamination par des endotoxines telles que le LPS (Ikon et al., 2017). En effet, il a été démontré que les HDL lient le LPS pour en assurer sa clairance, c'est pourquoi la présence d'endotoxine dans les HDL serait problématique (Levine et al., 1993).

Dans la présente étude, nous avons donc choisi de surexprimer l'ApoA-I humaine mature dans une souche *Clear coli*, en utilisant un plasmide avec des codons optimisés pour *E. coli* afin d'obtenir des transcriptions d'ARNm plus stables. En effet, les plasmides à codons optimisés permettent de faciliter la transcription de protéines chez la bactérie dont la machinerie de transcription n'est pas bien adaptée pour l'ensemble des codons présents dans les ARNm humains. L'avantage d'utiliser cette souche bactérienne est que celle-ci possède un LPS génétiquement modifié qui n'entraîne pas de réponse endotoxinique. Avec cette souche, le test de la liaison aux LPS n'est donc pas nécessaire (Isacchi et al., 1989; Viranaicken et al., 2017). Dans notre étude, un rendement de 25 mg d'ApoA-I est obtenu par litre de culture au sein de la souche *Clear Coli*.

La présence de l'étiquette histidine en N-terminal de l'ApoA-I permet de faciliter sa purification par chromatographie d'affinité et également la réduction de la contamination par les endotoxines dans certains cas (Ikon et al., 2017). L'introduction du site de clivage du TEV a également été bénéfique en raison de sa grande spécificité pour un seul site de clivage. En effet, la protéase TEV ne reconnaît que la séquence de clivage "ENLYFQG", contrairement à la protéase thrombine qui est beaucoup moins spécifique et qui a tendance à conduire à une protéolyse interne non désirée de l'ApoA-I (Ryan et al., 2003).

De plus, nous avons montré que le clivage de l'étiquette histidine n'a pas d'impact sur la structure de l'ApoA-I recombinante qui apparaît similaire à celle de l'ApoA-I plasmatique purifiée d'après les résultats obtenus en RMN. La structuration partielle de l'ApoA-I sans lipides en solution est en accord avec les études structurales précédentes qui montrent que la protéine adopte, dans des conditions physiologiques, une structure stable mais très flexible appelée "globule fondu" qui permet l'initiation de la formation des HDL par son association aux lipides. Le domaine N-terminal (résidus 1 à 184) forme un faisceau d'hélices tandis que le domaine C-terminal (résidus 185 à 243), essentiel pour la liaison aux lipides, n'a pas de structure définie dans l'ApoA-I sans lipides (Gursky & Atkinson, 1996; Mei & Atkinson, 2015).

Les résultats obtenus par SDS-PAGE et en spectrométrie de masse confirment le clivage de l'étiquette et la RMN l'intégrité de la protéine suite au clivage. En effet, la masse de rApoA-I obtenue en spectrométrie de masse correspond bien à la masse théorique de l'ApoA-I clivée, qui est de 28 135 Da.

Cependant, la masse réelle de l'ApoA-I plasmatique native est de 28 079 Da (Uniprot). Cette différence de masse est liée au clivage de l'étiquette. En effet, la protéase TEV reconnaît un site spécifique comme décrit précédemment, et elle coupe entre la glutamine (Q) et la glycine (Q). La différence de masse entre rApoA-I et l'ApoA-I native correspond donc au résidu glycine (G) ajouté en N-terminal de la protéine (outil de traduction ExPASy). L'autre avantage de notre méthode est que l'ApoA-I clivée purifiée peut être utilisée directement pour la reconstitution des HDL sans aucun traitement.

Différents types de lipides sont présents au sein des HDL endogènes. Parmi eux, la phosphatidylcholine (PC) est majoritaire, suivie de la sphingomyéline (SM) et de nombreux autres types de phospholipides. Selon le type de phospholipides choisi pour la production de rHDL, différents effets protecteurs peuvent être observés. Le POPC est un phospholipide largement utilisé dans la reconstitution de rHDL (Han et al., 2005; Schwendeman et al., 2015; Del Giudice et al., 2017). Il présente des effets anti-inflammatoires et antioxydants plus importants que les autres types de PL avec une capacité à induire l'efflux du cholestérol via ABCA1 (Darabi et al., 2016). Si d'autres types de PC tels que le DPPC ou le DMPC peuvent être utilisés (Jebari-Benslaïman et al., 2020; Frankel et al., 2021), nous avons privilégié l'utilisation du POPC.

Il existe de nombreuses méthodes pour produire des nanoparticules d'ApoA-I que nous avons décrites précédemment. Les méthodes les plus connues sont la préparation par sonication et la dialyse du cholate de sodium. La sonication est une méthode qui permet de former des vésicules unilamellaires facilitant ainsi l'incorporation de l'ApoA-I et donc la production de nanoparticules. Le cholate de sodium quant à lui agit comme un détergent non dénaturant qui permet de faciliter la solubilisation des phospholipides en milieu aqueux ainsi que l'insertion de l'ApoA-I dans la bicouche lipidique. La méthode de préparation utilisant le cholate de sodium reste cependant la plus utilisée dans la littérature. En effet, cette méthode a été utilisée pour la production de certaines rHDL (CSL-111 et CSL-112) utilisées dans des essais cliniques (Uribe et al., 2021), c'est pourquoi nous l'avons privilégié.

Cependant, cette méthode est de plus en plus remise en question car le cholate de sodium peut induire une hépatotoxicité. De plus, les méthodes utilisant la dialyse du cholate de sodium ainsi que la sonication restent des méthodes complexes, laborieuses et chronophages nécessitant plus de 24 heures de production. De nombreuses alternatives ont été développées afin de s'affranchir du cholate de sodium comme la microfluidique (Y. Kim et al., 2013). La microfluidique permet une bonne reproductibilité dans la reconstitution des nanoparticules, avec un rendement et une homogénéité élevée tout en réduisant le nombre d'étapes de production (Y. Kim et al., 2013). Des essais prometteurs sont en cours au sein du laboratoire.

Une fois les nanoparticules reconstituées, leur caractérisation est nécessaire pour montrer qu'elles possèdent une taille et une morphologie similaires à des HDL endogènes. Les méthodes de caractérisation les plus utilisées dans la littérature sont la DLS, la microscopie électronique et le dichroïsme circulaire (Schwendeman et al., 2015; Del Giudice et al., 2017; Frankel et al., 2021). Ici nous avons effectué la caractérisation par DLS et par microscopie électronique et nous avons obtenu des tailles de nanoparticules voisines de 7 nm, en cohérence avec les données de la littérature qui utilisent les mêmes méthodes de production (cholate de sodium) et de caractérisation (Del Giudice et al., 2017; Jebari-Benslaiman et al., 2020). Plutôt que la méthode de dichroïsme circulaire, classiquement utilisée pour caractériser la conformation d'ApoA-I (% d'hélice- α) dans les rHDL, nous avons privilégié la RMN qui permet une caractérisation structurale beaucoup plus fine. Nous avons ainsi démontré que notre ApoA-I recombinante avait une conformation similaire à l'ApoA-I plasmatique, aussi bien en absence de lipides qu'au sein des rHDL.

Les tests des propriétés protectrices des rHDL ont été effectués *in vitro* avant de passer *in vivo* chez la souris. Les tests les plus utilisés dans la littérature sont : le test d'activation de la LCAT, le test d'efflux du cholestérol, l'effet anti-inflammatoire des rHDL ainsi que les tests d'activité protectrice de l'endothélium par le suivi de l'expression de ICAM-1 et VCAM-1, marqueurs de l'activation endothéliales en réponse à une inflammation (Hafiane & Genest, 2015).

Pour notre étude, il nous est apparu pertinent d'étudier la captation cellulaire des rHDL, leur effet anti-inflammatoire ainsi que leur capacité à réduire l'expression de ICAM et VCAM, car le principal objectif est d'utiliser les nanoparticules comme vecteur thérapeutique pour le traitement de pathologies inflammatoires telles que les maladies cardiovasculaires ou encore les infections pulmonaires. Nos différents résultats ont montré des propriétés anti-inflammatoires associées à une activité endothélio-protectrice pour les rHDL avec l'ApoA-I contenant ou non l'étiquette histidine. La présence de l'étiquette ne semble donc pas avoir d'impact sur les propriétés protectrices des nanoparticules et, par conséquent, on pourrait mettre à profit cette propriété et utiliser ce type de rHDL pour transporter des molécules qui n'auraient aucune affinité pour l'ApoA-I ni pour les phospholipides.

La finalité de cette étude est de pouvoir utiliser ces nanoparticules de rHDL dans le cadre d'une administration thérapeutique, en particulier pour le traitement des pathologies pulmonaires en privilégiant la voie privilégiant l'aérosolisation. Cette administration alternative a permis d'obtenir une bonne répartition des rHDL dans les poumons des souris dès 6 heures, aussi bien pour les rHDL contenant une ApoA-I avec l'étiquette que pour celles reconstituées avec l'ApoA-I clivée. Toutefois à ce temps d'expérience, nous n'avons pas détecté la présence des nanoparticules dans les autres tissus tels que le foie et le cerveau, ce qui suggère que les rHDL ne sont pas encore passées dans la circulation

sanguine.inhalée. C'est dans cette perspective que nous avons effectué, dans un premier temps, un test de biodisponibilité par administration directe dans les poumons par instillation chez des souris C57Bl/6. Cette instillation consistait à déposer des petits volumes de solution de CSL-111 au niveau de la narine de la souris mais la répartition très hétérogène des nanoparticules sous forme de spots dans les poumons nous a conduit à optimiser la méthode d'administration des rHDL en

V. Conclusion

Ce travail nous a permis dans un premier temps de produire en grande quantité et de façon reproductible de l'ApoA-I recombinante utilisée par la suite pour reconstituer des rHDL. La production de nanoparticules de rHDL a été effectuée avec deux formes de rApoA-I : avec l'étiquette et sans l'étiquette. Les résultats de caractérisation de ces nanoparticules ont montré une taille et une morphologie similaires aux HDL discoïdales endogènes. De plus, des effets protecteurs des rHDL que nous avons mis en évidence ne semblent pas impactés par la présence de l'étiquette histidine. Il en est de même pour leur biodisponibilité au niveau des poumons de la souris suite à leur aérosolisation. Ensemble, ces résultats poussent à développer des rHDL enrichies avec des molécules d'intérêt afin de les utiliser dans le traitement de différentes pathologies, notamment l'inflammation pulmonaire, en utilisant la voie d'administration par aérosolisation.

Partie II : Enrichissement des nanoparticules de rHDL par l'alpha-1-antitrypsine

I. Introduction

Les HDL sont des nanoparticules naturelles au sein de l'organisme qui font d'elles un véhicule idéal pour l'administration ciblée d'agents diagnostiques et thérapeutiques. Des nanoparticules de HDL ont notamment été reconstituées pour transporter des nanocristaux inorganiques comme agents de contraste pour l'imagerie médicale mais aussi pour servir de véhicules d'administration de siARN ou de molécules thérapeutiques (Y. Kim et al., 2013).

Dans la première partie expérimentale, nous avons pu montrer que nos nanoparticules rHDL reconstituées à partir d'ApoA-I recombinante pouvaient être captées *in vitro* par des cellules endothéliales et épithéliales et que leur administration par aérosolisation chez des souris permettait leur distribution de façon homogène dans les poumons. Etant donné que l'AAT est considérée comme une protéine clé dans la modulation des inflammations pulmonaires, elle apparaît donc comme une molécule de choix pour être vectorisée par nos nanoparticules. En particulier, cette stratégie pourrait être adaptée pour des patients souffrant un déficit en AAT et, par conséquent, sujets à des dégradations protéolytiques des alvéoles pulmonaires à l'origine du développement des emphysèmes (Fregonese & Stolk, 2008; Teckman & Blomenkamp, 2017).

L'AAT est un inhibiteur naturel des protéases à sérine, comme l'élastase neutrophile, produite au sein des hépatocytes. Cet inhibiteur est présent au sein des tissus lésés comme les poumons afin de prévenir des lésions protéolytiques. Des études protéomiques effectuées sur le plasma de sujets sains ont permis d'identifier sa présence ainsi que son activité anti-élastase au sein des HDL endogènes (Ortiz-Muñoz et al., 2009; Moreno et al., 2014). Les HDL semblent donc être de bons vecteurs pour transporter et distribuer l'AAT.

L'objectif de cette étude est de reconstituer des nanoparticules enrichies en AAT afin de pouvoir les utiliser *in fine* dans le traitement des pathologies pulmonaires en privilégiant la voie par aérosolisation.

Pour répondre à ces objectifs, des rHDL ont été produites à partir d'ApoA-I recombinantes taguées ou non taguées et ont été enrichies en AAT directement pendant la préparation des HDL. Différentes méthodes de purification ont ensuite été testées afin d'éliminer au mieux la totalité de l'AAT libre et purifier les nanoparticules. La taille et les propriétés intrinsèques des rHDL enrichies et purifiées ont ensuite été caractérisées par différentes méthodes.

II. Matériels et méthodes

1. Production de nanoparticules de rHDL enrichies en AAT (rHDL_{AAT})

La reconstitution des nanoparticules de rHDL_{AAT} a été réalisée selon la même méthode que celle utilisée pour les nanoparticules non enrichies dans la première partie (Figure 44). Un rapport molaire de 1:1:75 entre l'ApoA-I, l'AAT et le POPC a été utilisé pour la reconstitution. Ici, le POPC est dissous dans une solution chloroforme:méthanol (2:1, v/v) et séché pendant 2 heures sous un flux d'azote. La remise en suspension des lipides dans 500 μ L de tampon TEN (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM) est suivie de l'ajout du cholate de sodium en quantité équimolaire et de dix cycles de congélation/décongélation afin de favoriser la formation de vésicules multilamellaires. À cette étape, l'ApoA-I (forme clivée ou non) et l'AAT sont ajoutées et le mélange est incubé sous agitation pendant 16 heures à 37 °C. L'échantillon est ensuite dialysé contre du tampon TEN pendant 3 jours (cinq dialyses successives de 10 à 12 heures) à 4 °C. Avant l'utilisation ou la conservation des HDL reconstituées, il est nécessaire d'éliminer l'AAT libre n'ayant pas été incorporé dans les nanoparticules (Figure 56).

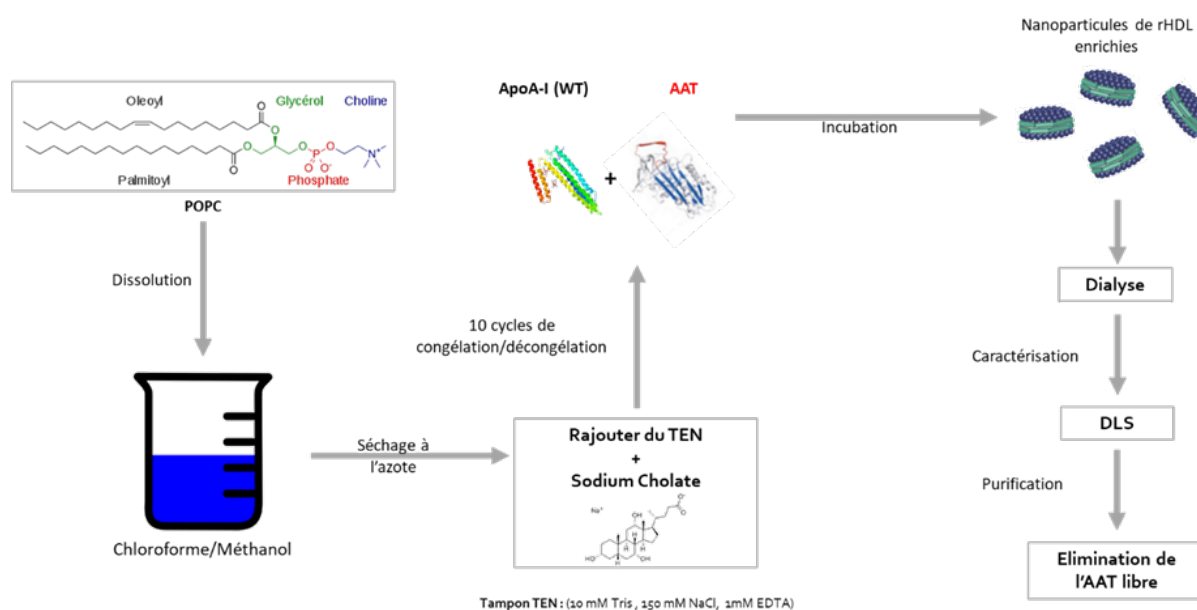


Figure 56 : Les étapes de la production de nanoparticules enrichies (rHDL_{AAT}).

2. Élimination de l'AAT libre

Nous avons utilisé différentes approches méthodologiques pour l'élimination de l'AAT libre : séparation de l'AAT libre des rHDL par ultracentrifugation, par chromatographie d'exclusion et par chromatographie d'affinité.

a. Purification par ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est une méthode qui permet de séparer les molécules en fonction de leur densité. Ici le principe repose sur le fait que la densité de l'AAT libre est plus faible que celle des rHDL_{AAT}. Pour effectuer cette séparation, la densité des préparations de rHDL_{AAT} est ajustée à 1,21 g/mL par ajout de bromure de potassium (KBr). Les 3 mL d'échantillon alourdi sont déposés dans les tubes d'ultracentrifugation et sont recouverts par 8 mL de solution saline de KBr ($d = 1,21$). Le même protocole est appliqué pour des échantillons référence de rHDL et d'AAT. L'ultracentrifugation est effectuée à 34 500 rpm pendant 20 h à 4 °C avec un rotor de SW 41 Ti et dans une ultracentrifugeuse Optima L-80 XP (Beckman Coulter). Les échantillons sont ensuite prélevés par fraction de 1 mL tout le long du tube allant du haut vers le bas. Pour chaque fraction, le KBr est éliminé par cinq étapes de lavage ($5 \times 500 \mu\text{L}$ de solution PBS) avec un dispositif d'ultrafiltration Amicon Ultra (Millipore, coupure 3 KDa). Les fractions sont ensuite analysées sur un gel SDS-PAGE 12 % après coloration au bleu de Coomassie.

b. Purification par chromatographie d'exclusion

Trois colonnes de gel filtration différentes ont été testées pour éliminer l'AAT libre en excès des échantillons rHDL_{AAT} par chromatographie d'exclusion de taille : une colonne Superose[®] 6 Increase 10/300 GL, une colonne HiLoad 16/60 Superdex[®] 75 pg et une colonne Superdex[®] 200 Increase 10/300 GL (Figure 57). Le tampon d'élution utilisé pour ces chromatographies est du PBS à pH 8.0 avec un débit d'élution de 0,3 mL/min dans la colonne.

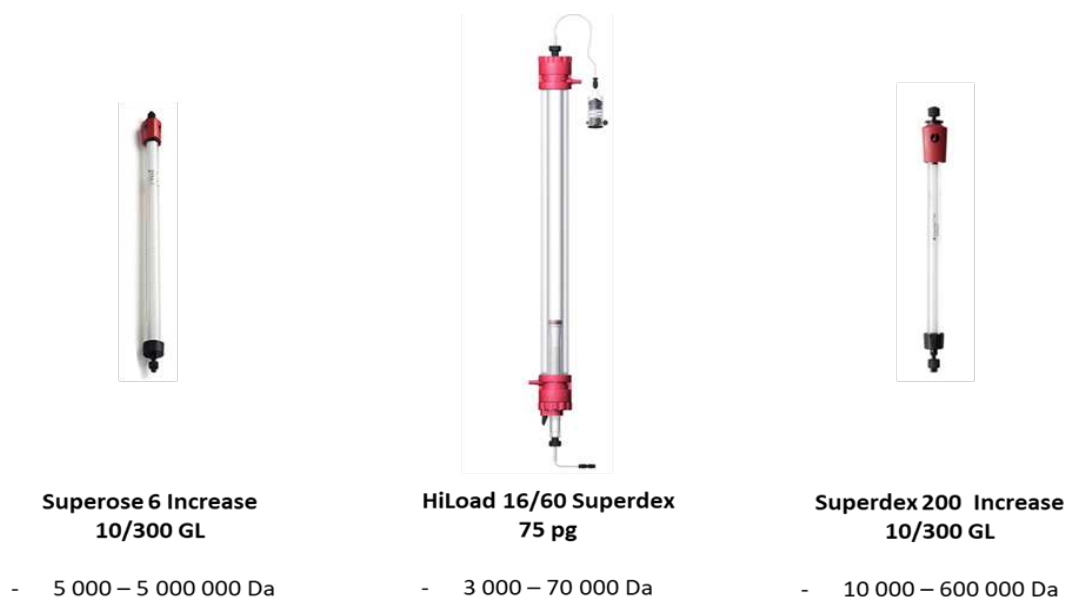


Figure 57 : Les différentes colonnes de gel filtration utilisées pour l'élimination de l'AAT libre. La dernière ligne correspond au domaine de fractionnement de chacune des colonnes.

c. Purification par chromatographie d'affinité

Une chromatographie d'affinité sur une colonne HP His Trap 5mL a été effectuée pour l'élimination de l'AAT libre (voir méthode dans la partie 1). Pour cette chromatographie, l'élution a été réalisée par trois paliers d'imidazole de concentration croissante (0 mM, 150 mM et 500 mM).

3. Caractérisation des rHDL enrichies par DLS

La taille des particules et la distribution des rHDL enrichies ont été analysées sur un Zetasizer Nano (Malvern Instruments) à DLS. Les analyses ont été effectuées en solution aqueuse après filtration des échantillons des rHDL enrichies à travers un filtre à seringue PTFE de 0,22 µm de porosité afin d'éliminer les petits agrégats de polymères. Chaque analyse a été réalisée à 25 °C trois fois avec un angle de détection de 175°.

4. Dosage de l'AAT enrichie dans les His-rHDL_{AAT}

Un dosage de l'AAT intégrée dans les rHDL a été effectué par Western Blot en utilisant une gamme d'étalonnage obtenue à partir de quantités connues en AAT (12,5 ng ; 25 ng ; 50 ng ; 100 ng et 200 ng), ainsi que de 1 et 2 µg de His-rHDL_{AAT} déposées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose pour l'analyse immunoblot. La membrane est tout d'abord bloquée pendant une nuit à 4 °C dans un tampon TBS (50 mM Tris-HCl et 150 mM NaCl, pH 7,4) contenant 0,1 % (v/v) de Tween 20 et 5 % (w/v) de lait non gras. Cette étape de blocage est suivie d'une incubation avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre l'AAT humaine (Abcam, dilution 1/5 000) (2 heures à température ambiante). La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée 1 heure avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à la HRP (Jackson, dilution 1/2 000). Entre chaque étape d'incubation, la membrane est lavée trois fois avec du TBS/0,1 % Tween 20. La détection des protéines est réalisée à l'aide du réactif de chimioluminescence améliorée (ECL, GE Healthcare) et du système Imager 600 (GE Healthcare).

5. Test de dosage de l'inhibition de l'activité de l'élastase

Le dosage de l'inhibition de l'élastase est basé sur une méthode spectrofluorimétrique utilisant le MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-7-Amino-4-Méthylcoumarine (AAPV-AMC, Calbiochem) comme substrat fluorescent (Figure 58). De l'élastase leucocytaire des expectorations humaines (EPC) est utilisée pour ce test à une concentration de 100 nM. Celle-ci est préparée à partir d'une solution mère de 10 µM dans 50 mM d'acétate de sodium (pH 5,5) et, 200 mM de NaCl. Le substrat AAPV-AMC est préparé dans du DMSO à une concentration de 5,7 mM. 25 µL d'échantillon de rHDL (enrichies ou non en AAT)

sont mélangés avec 50 µL d'élastase (100 nM soit 0,128 unité catalytique) et avec 50 µL de substrat AAPV-AMC (0,12 mM dans 25 mM de Tris, pH 7,5). L'émission de fluorescence du substrat amino-4-méthylcoumarine est mesurée en cinétique pendant 20 minutes, à 37 °C à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 380 et de 460 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (BMG Labtech). L'inhibition de l'élastase a été calculée à l'aide de l'équation suivante : % d'inhibition de l'élastase = $[1 - (A/B)] \times 100$, où A et B représentent respectivement les valeurs de la pente cinétique en présence et en absence de l'AAT seule ou sein des rHDL enrichies.

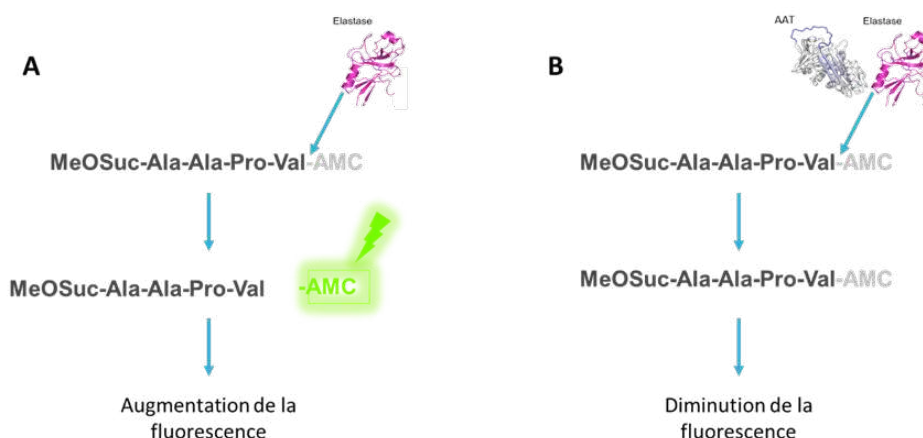


Figure 58 : Principe de la méthode de dosage de l'inhibition de l'activité élastase. A) Clivage du substrat fluorescent par l'élastase qui induit une augmentation de l'émission de fluorescence et B) inhibition de l'activité élastase par AAT qui entraîne une diminution de l'émission de fluorescence.

6. Détermination de la captation des His-rHDL_{AAT} par les cellules EA.hy926

Pour la captation des His-rHDL_{AAT} par les cellules EA.hy926, déterminée par immunocytochimie, les cellules sont mises en culture sur une lame Millicell 8 puits EZ (Millipore) et incubées avec des His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 6 heures. A la fin de la stimulation, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, fixées pendant 15 minutes dans une solution de paraformaldéhyde à 4 % et lavées de nouveau avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec du PBS/Triton X-100 0,5 % en deux incubations de 5 minutes, puis bloquées dans une solution de PBS/BSA 1 % pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre l'anti-ApoA-I humain (Calbiochem, dilution 1/500). Après une incubation sur une nuit à température ambiante, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, puis incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin conjugué à Alexa 488 (Jackson, dilution 1/2 000) (2 heures à température ambiante). Les lames sont rincées trois fois avec du PBS et les noyaux cellulaires marqués avec du DAPI (Sigma, 0,1 µg/mL). Les lames sont enfin lavées avec du PBS avant leur montage avec un milieu de montage fluorescent (Fluoromount, Thermofisher). Les images des lames sont obtenues à l'aide d'un scanner numérique de lames NanoZoomer S60 (Hamamatsu).

7. Test au rouge neutre pour déterminer la cytotoxicité des His-rHDL_{AAT}

Le test colorimétrique au rouge neutre a été utilisé pour l'évaluation quantitative de la viabilité cellulaire à la suite la stimulation des cellules EA.Hy926 par les nanoparticules His-rHDL_{AAT}. Ce test est basé sur la capacité des cellules viables à incorporer le rouge neutre dans les lysosomes (Repetto et al., 2008). Les cellules EA.hy926 sontensemencées dans une plaque à 96 puits (5.10^4 cellules/puits). A la confluence cellulaire, celles-ci sont déprivées en sérum pendant 2 heures et sont stimulées en absence ou présence de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 24 heures. A la fin de la stimulation le milieu est éliminé, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et 100 μ L de milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté en rouge neutre (80 μ g/mL) sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont incubées pendant 2 heures à 37 °C, suivie de l'élimination du milieu et d'une étape de trois lavages des cellules avec du PBS. Finalement, 200 μ L d'une solution de décoloration (eau:éthanol:acide acétique, 50:50:1, v/v) sont ajoutés dans chaque puits pour solubiliser le colorant et l'absorbance mesurée à 540 nm permet de déterminer le pourcentage de cellules viables.

8. Détection in situ de l'apoptose cellulaire par la technique TUNEL

La technique TUNEL (Terminal transferase dUTP nick-end) est utilisée pour la détection de l'ADN fragmenté caractéristique de l'apoptose cellulaire (kit de détection - Roche Diagnostics). Les cellules EA.hy926 sontensemencées à 5.10^4 cellules/puits sur une lame Millicell 8 puits EZ (Millipore) dans du milieu DMEM supplémenté de sérum de veau fœtal 10 %. A la confluence cellulaire, celles-ci sont déprivées en sérum 2 heures avant d'être stimulées avec de l'élastase (400 nM), en absence ou en présence de His-rHDL (0,4 mg/mL) ou de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 6 heures. Les cellules EA.hy926 sont fixées dans du PBS/PFA 4 % pendant 10 minutes à température ambiante et traitées selon le protocole du fabricant. Les noyaux cellulaires sont ensuite marqués avec du DAPI et les images sont capturées avec un microscope à fluorescence Eclipse 80i Nikon équipé d'une caméra numérique Hamamatsu ORCA-ER (Life Sciences, Japon).

9. Suivi de la physiologie par impédancemétrie

Les cellules EA.hy926 ont étéensemencées ($2,5.10^4$ cellules/puits) sur des plaques xCELLigence 16 puits E (Acea Biosciences). L'index cellulaire a été enregistré en continu durant la phase de prolifération cellulaire jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la confluence du tapis cellulaire (à 90 heures). Les cellules sont stimulées avec différentes concentrations en élastase (800 nM, 400 nM, 200 nM et 100 nM) et pour certaines concentrations (400 nM et 200 nM) en présence de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL). Les index cellulaires sont mesurés toutes les 15 minutes durant l'expérience (jusqu'à 70 heures après la stimulation).

10. Extraction de l'ARN et RT-qPCR

Les cellules EA.hy926 sont ensemencées dans une plaque 6 puits ($3 \cdot 10^5$ cellules/puit). À confluence, les cellules sont déprivées en sérum pendant 2 heures et sont ensuite stimulées avec des His-rHDL ou des His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 6 heures, en absence ou en présence de TNF α (5 ng/mL). L'ARN total est extrait des cellules avec le réactif TRIzolTM (Invitrogen) et environ 2 μ g d'ARN total sont utilisés pour synthétiser l'ADNc par transcription inverse (RT) à l'aide d'amorces aléatoires random hexamer et de l'enzyme NxGen® M-MuLV (Lucigen). La réaction en chaîne de la polymérase quantitative (qPCR) pour les différents gènes cibles (IL-6 et ICAM-1) a été réalisée en utilisant le réactif BrightGreenTM (ABM) et les résultats obtenus sont analysés sur le système CFX96 (Biorad). L'expression relative de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 (sens : GGT ACA TCC TCG ACG GCA TCT et antisens : GTG CCT CTT TGC TGC TTT CAC) et de la protéine d'adhésion ICAM-1 (sens : GGC CTC AGT CAG TGT GA et antisens : AAC CCC ATT CAG CGT CA) a été normalisée par rapport à l'expression de l'ARN ribosomique 18S (sens : ATT AAG GGT GTG GGC CGA AG et antisens : TGG CTA GGA CCT GGC TGT AT).

11. Quantification de la sécrétion d'IL-6 par ELISA

Les cellules EA.hy926 ont été ensemencées dans une plaque à 12 puits (10^5 cellules/puits). À confluence, les cellules sont déprivées en sérum pendant 2 heures et sont ensuite stimulées avec des His-rHDL ou des His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 24 heures, en absence ou en présence de TNF α (5 ng/mL). Les milieux de culture cellulaire sont recueillis et la sécrétion de l'IL-6 est déterminée à l'aide d'un kit ELISA Ready-SET-Go® pour l'IL-6 humaine (ThermoFisher). L'absorbance est mesurée avec un lecteur de microplaques (FLUOstar Optima, BMG Labtech) à 450 et 570 nm à partir desquelles la quantité en cytokine est calculée.

12. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM d'expériences multiples. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Prism (Prism software, GraphPad, USA). Les différences significatives ($p < 0,05$) entre les moyennes ont été déterminées respectivement par des procédures d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivies du test de comparaison multiple de Tukey.

III. Résultats

1. Optimisation de l'élimination de l'AAT libre dans les nanoparticules His-rHDL_{AAT}

a. Par ultracentrifugation

Dans un premier temps nous avons reconstitué des rHDL enrichies en AAT à partir de rApoA-I clivée ne contenant pas l'étiquette histidine. Après la reconstitution des rHDL enrichies, nous avons essayé d'éliminer l'AAT libre non incorporée dans les nanoparticules par ultracentrifugation. La répartition théorique des différentes fractions délimitées en trois zones A, B et C est représentée sous forme de schéma (Figure 59 A).

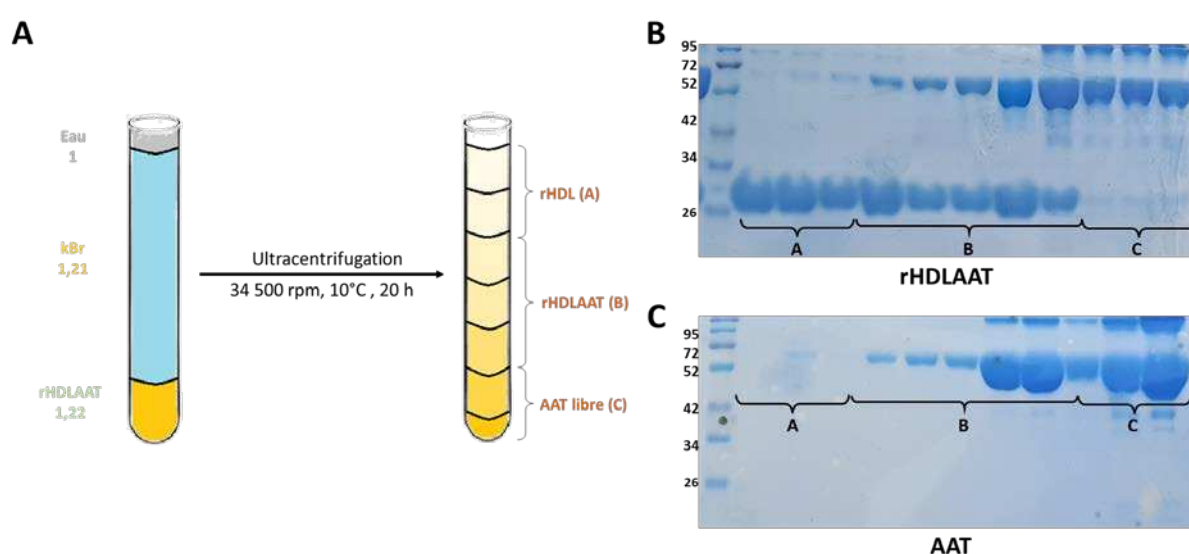


Figure 59 : Purification de rHDLAAT par ultracentrifugation et analyse des fractions de la purification sur gel SDS-PAGE 12 %. A) Schéma représentatif de la répartition théorique des différents composés après l'ultracentrifugation. Les différentes fractions recueillies tout le long du tube ont été prélevées et déposées sur gel SDS-PAGE 12 % afin de déterminer le contenu de chaque fraction. Analyse sur gel SDS-PAGE 12 % pour B) rHDL_{AAT} et C) l'AAT seule.

Les gels SDS-PAGE 12 % montrent les différentes fractions prélevées tout le long du tube après l'ultracentrifugation pour les rHDL_{AAT} et l'AAT seule. Le profil électrophorétique des fractions de rHDLAAT (Figure 59 B) montre que l'ApoA-I est retrouvée seule (bande à 27 kDa) tout en haut du tube (zone A) avec une faible quantité d'AAT (bande vers 52 kDa), ce qui pourrait correspondre aux rHDL ayant été enrichies en AAT. En revanche, les fractions de la zone intermédiaire (zone B) montrent la présence des deux protéines (ApoA-I et AAT) avec un ratio AAT:ApoA-I croissant, qui laisse supposer que ces fractions contiennent des nanoparticules et de l'AAT libre. D'ailleurs, l'analyse du gel pour l'AAT seule (Figure 59 C) montre que la protéine est présente dans toutes les fractions intermédiaires de la zone B. En résumé, la présence simultanée de l'AAT et des nanoparticules dans la plupart des

fractions montre que la séparation ne s'est pas bien effectuée et que cette méthode de purification ne nous a pas permis de séparer efficacement l'AAT libre des rHDL_{AAT}.

b. La chromatographie d'exclusion

Une alternative à l'ultracentrifugation est la chromatographie d'exclusion. Pour cette technique, nous avons testé trois colonnes de gel filtration possédant des domaines de fractionnement et des résolutions différentes. Pour chacune des colonnes utilisées, les profils de purification sont présentés pour les nanoparticules de rHDL et rHDL_{AAT} ainsi que pour l'AAT libre (Figure 60 A, C, E). L'identification par Western Blot des fractions majeures issues de la purification des nanoparticules de rHDL_{AAT} est également présentée (Figure 60 B, D, F).

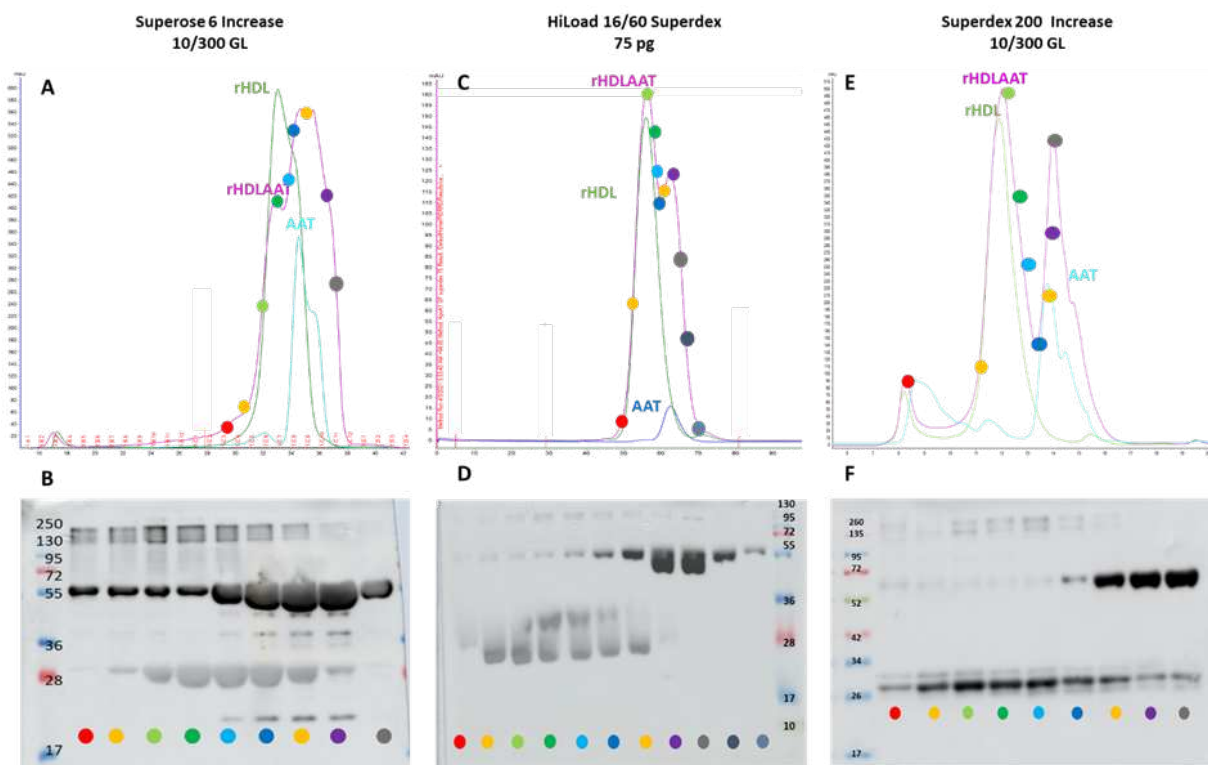


Figure 60 : Purification des rHDLAAT par différentes colonnes de gel filtration et analyse des fractions d'élution par Western Blot. Profil de purification des rHDL_{AAT} (magenta), rHDL (vert) et AAT libre (bleu) par chromatographie d'exclusion sur les colonnes : A) Superose 6, C) Superdex 75 et E) Superdex 200. B), D) et F) Les différentes fractions représentées par un point coloré sur les profils chromatographiques sont analysées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-ApoA-I et un anticorps anti-AAT.

Avec la colonne Superose 6 Increase 10/300 GL, on observe que les pics du chromatogramme pour les rHDL_{AAT} se superposent à ceux obtenus pour les rHDL et pour l'AAT (Figure 60 A). De plus, l'analyse par Western Blot des différentes fractions représentées par des cercles de couleur montre que la plupart des fractions présentent les bandes à 55 kDa et 27 kDa correspondant respectivement à l'AAT et à l'ApoA-I (Figure 60 B). Cela signifie que la plupart des fractions contiennent à la fois les nanoparticules

de rHDL_{AAT} et l'AAT libre et que, par conséquent, cette colonne ne permet pas de faire une bonne séparation ni d'éliminer l'AAT libre.

Avec la colonne HiLoad 16/60 Superdex 75, le profil de chromatographie présente deux pics se superposant respectivement à celui des rHDL et de l'AAT (Figure 60 C). Le premier pic pourrait correspondre aux rHDL enrichies et le deuxième à l'AAT libre. L'analyse des différentes fractions par Western Blot permet de confirmer cette hypothèse. Les fractions du premier pic montrent la présence d'ApoA-I avec de petites quantités d'AAT équivalentes à des HDL enrichies. La présence d'une seule bande dans les dernières fractions du deuxième pic correspond à de l'AAT seule (Figure 60 D). Cependant, le ratio AAT:ApoA-I augmente progressivement dans les premières fractions suggérant une contamination des nanoparticules enrichies par de l'AAT libre et montrant que cette colonne n'est également pas assez résolutive pour séparer totalement les rHDL_{AAT} et l'AAT libre.

La Superdex 200 Increase 10/300 GL permet d'obtenir une meilleure séparation pour les rHDL_{AAT}, étant donné que nous observons les deux pics principaux du chromatogramme mieux séparés et correspondant respectivement aux nanoparticules de rHDL_{AAT} et à l'AAT libre (Figure 60 E). En effet, l'analyse par Western Blot des fractions correspondant au premier pic montre la présence des deux protéines avec un ratio AAT:ApoA-I qui reste constant, suggérant l'absence de contamination par de l'AAT libre (Figure 60 F). On peut toutefois noter que sur le chromatogramme de l'AAT seule, on observe plusieurs pics (correspondant probablement pour les deux premiers à des formes agrégées de l'AAT), dont le second possède un volume d'élution similaire à celui des rHDL_{AAT}. La présence en faible quantité de ces agrégats d'AAT dans le pic d'élution des rHDL_{AAT} ne peut donc pas être exclue. Sur le chromatogramme des rHDL_{AAT}, les dernières fractions correspondant au deuxième pic contiennent une quantité croissante d'AAT avec une quantité décroissante d'ApoA-I laissant supposer que ces fractions d'AAT libres sont contaminées par des nanoparticules et que, par conséquent, cette colonne ne permet pas non plus de récupérer la totalité des rHDL enrichies et pures.

c. La chromatographie d'affinité

La méthode de purification par chromatographie d'affinité implique l'utilisation de l'ApoA-I contenant l'étiquette histidine. Avec cette protéine non clivée, la méthode de reconstitution et d'enrichissement reste identique. Après la reconstitution des nanoparticules de rHDL enrichies en AAT, celles-ci sont chargées sur une colonne d'affinité HisTrap, ainsi que les nanoparticules de His-rHDL et l'AAT qui sont passées séparément.

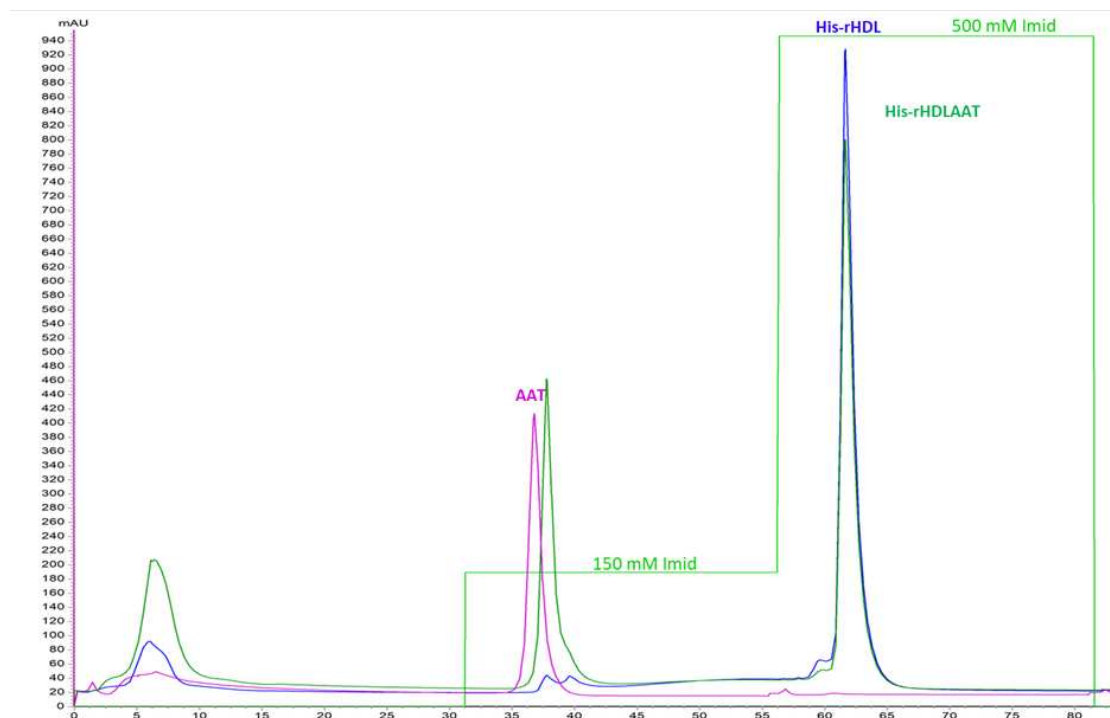


Figure 61 : Profil de purification des His-rHDLAAT par chromatographie d'affinité sur une colonne HisTrap. La courbe magenta correspond au profil de l'AAT libre, la courbe bleue correspond à His-rHDL et la courbe verte à His-rHDLAAT.

L'analyse du profil chromatographique des rHDL_{AAT} montre la présence de trois pics principaux très bien séparés selon les différents paliers d'élution en imidazole (Figure 61). Le premier pic observé, sortant avec un tampon d'élution sans imidazole, correspond à des agrégats de phospholipides et de protéines. Le deuxième pic, élué par 150 mM d'imidazole, correspond aux fractions contenant de l'AAT libre, attestant que l'AAT a une faible affinité pour la colonne. Enfin, le troisième pic rassemble les fractions éluées avec 500 mM d'imidazole qui correspondent aux nanoparticules de His-rHDL enrichies ou non. Pour confirmer ces observations, les principales fractions de chaque pic du chromatogramme des rHDL_{AAT} sont analysées par Western Blot (Figure 62 A).

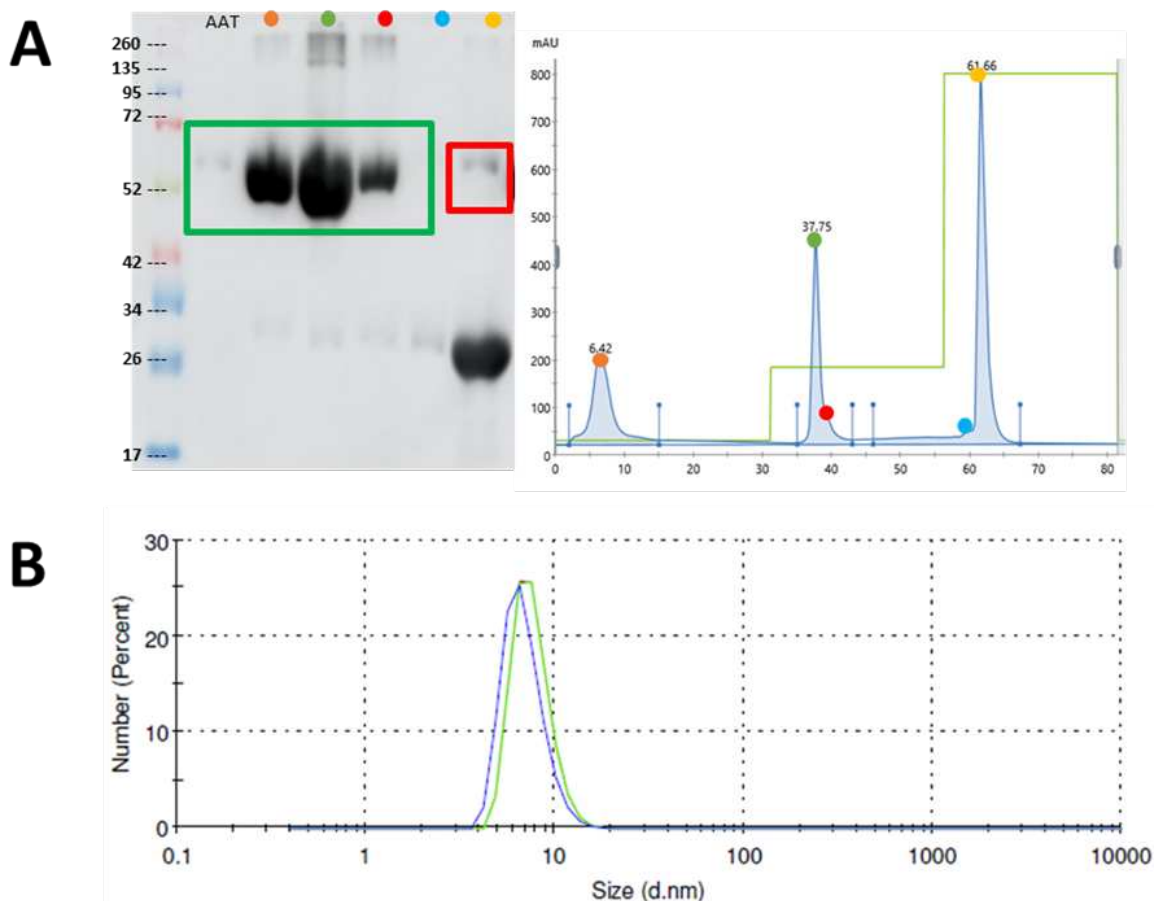


Figure 62 : Les His-rHDL sont enrichies en AAT et présentent une bonne taille. A) Les His-rHDL ont été enrichies avec une quantité équimolaire d'AAT:ApoA-I. Une purification par chromatographie d'affinité sur colonne HisTrap a été réalisée. Les différentes fractions des trois principaux pics du chromatogramme, représentées par un point coloré sont analysées par Western Blot en utilisant un anticorps anti-ApoA-I et un anticorps anti-AAT. Les fractions contenant de l'AAT libre sont représentées par un encadré vert et la fraction enrichie par un encadré rouge. (B) Distribution de la taille en fonction du nombre de particules des His-rHDL enrichies.

Les trois premières fractions relatives aux deux premiers pics d'élution présentent une bande très intense à 55 kDa spécifique de l'AAT, confirmant que ces fractions contiennent probablement la majorité de l'AAT libre. La fraction du troisième pic, quant à elle, concentre toutes les nanoparticules enrichies comme l'atteste la présence de deux bandes spécifiques de l'ApoA-I et de l'AAT. En revanche, la faible intensité de la bande relative à l'AAT laisse supposer un faible enrichissement des nanoparticules. Par ailleurs, l'analyse en DLS de cette dernière fraction montre que les nanoparticules enrichies possèdent une taille d'environ 7 nm, similaire aux nanoparticules de His-rHDL, indiquant que l'enrichissement n'a pas eu d'impact sur leur taille (Figure 62 B). Ces résultats montrent que cette méthode de purification par chromatographie d'affinité est la plus efficace pour purifier les nanoparticules enrichies.

2. Dosage de l'AAT dans les nanoparticules enrichies His-rHDL_{AAT}

Suite à l'enrichissement et la purification des nanoparticules His-rHDL_{AAT}, la quantité d'AAT incorporée dans les nanoparticules est quantifiée par Western Blot en utilisant des standards de calibration d'AAT de quantités connues (12,5 à 200 ng) (Figure 63). Le dosage a été effectué sur deux lots de His-rHDL_{AAT} (pour des quantités de 2 et 5 µg).

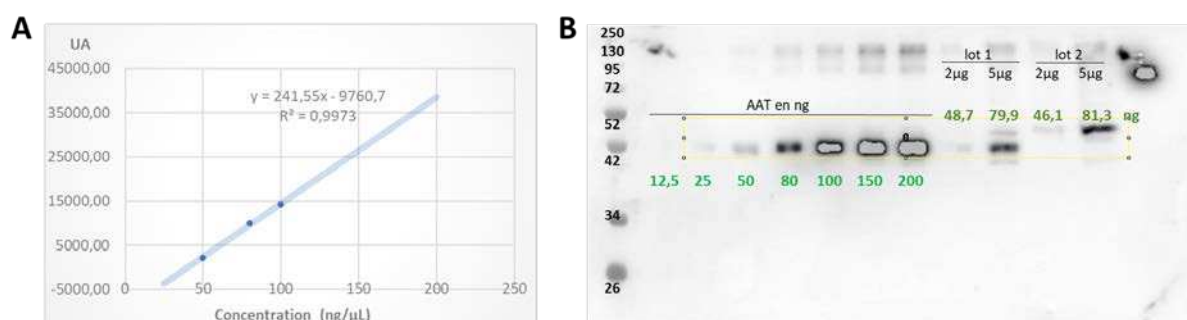


Figure 63 : Dosage par densitométrie de la quantité d'AAT présente dans les His-rHDL_{AAT}. A) Graphique de la gamme étalon d'AAT représentant la densitométrie en fonction de la quantité. B) Deux quantités connues de His-rHDL_{AAT} (2 et 5 µg) et une gamme allant de 12,5 ng à 200 ng (12,5 ; 25 ; 50 ; 80 ; 100 ; 150 ; 200 ng) de AAT ont été analysés par Western Blot en utilisant l'anticorps anti-AAT. La densité des bandes a été mesurée avec le logiciel ImageJ pour calculer la quantité d'AAT présente dans le His-rHDL_{AAT}.

La mesure de densitométrie pour les standards d'AAT a permis d'obtenir la courbe étalon densitométrie vs quantité d'AAT à partir de laquelle l'équation de la droite de régression a été déterminée. Les trois derniers points ont été éliminés du fait de la saturation du signal. La quantité d'AAT présente dans les His-rHDL_{AAT} a alors pu être calculée à partir de l'équation (Figure 63 A). Pour les deux lots de His-rHDL_{AAT}, 48,7 ng et 46,1 ng d'AAT sont obtenus dans 2 µg de nanoparticules, soit un ratio massique moyen d'enrichissement AAT:ApoA-I de 2,4 % (Figure 63 B). Pour 5 µg de nanoparticules, 79,9 ng et 81,3 ng d'AAT sont calculés dans les deux lots, soit environ 1,5 % d'enrichissement. Ces résultats montrent que le taux d'enrichissement moyen est voisin de 2 %, ce qui constitue un enrichissement des nanoparticules relativement faible.

3. Caractérisation des propriétés des His-rHDL_{AAT}

a. Test de la capacité des His-rHDL_{AAT} à inhiber l'activité de l'élastase

L'action principale de l'AAT est de réguler l'activité de l'élastase produite par les neutrophiles en situation inflammatoire. Cette capacité d'inhibition de l'élastase a été mesurée par un test fluorimétrique sur 125 µg de His-rHDL et de His-rHDL_{AAT} ainsi que sur 2,5 µg d'AAT correspondant à la quantité d'AAT incorporée dans 125 µg nanoparticules enrichies (sur la base d'un enrichissement de 2 %).

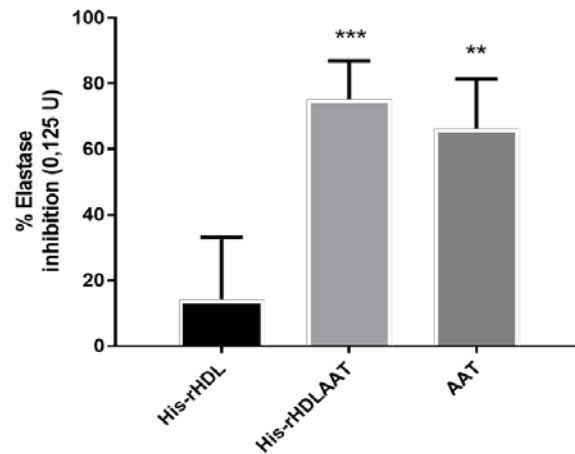


Figure 64: Les nanoparticules de His-rHDLAAT inhibent l'activité de l'élastase. Pourcentage d'inhibition de l'élastase (0,125 UC) induite par les nanoparticules de His-rHDL (125 µg), His-rHDL_{AAT} (125 µg) ou par l'AAT (2,5 µg). L'inhibition de l'élastase a été déterminée par une méthode spectrophotométrique utilisant un acide fluorogène comme substrat : MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-7-Amino-4-Méthylcoumarine (AAPV-AMC). Les données sont représentées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n = 3). **p < 0,01 ; ***p < 0,001 par rapport à His-rHDL.

L'analyse des résultats montre que les nanoparticules non enrichies inhibent l'activité de l'élastase à environ 15 % tandis que cette capacité d'inhibition atteint 75 % en présence de 125 µg de His-rHDL_{AAT} (Figure 64). L'AAT seule exerce une inhibition de 65 % de cette activité. Ces résultats suggèrent que les nanoparticules de His-rHDL_{AAT} ont une activité anti-élastase similaire à l'AAT seule.

b. Captation des particules His-rHDL_{AAT} par les cellules endothéliales

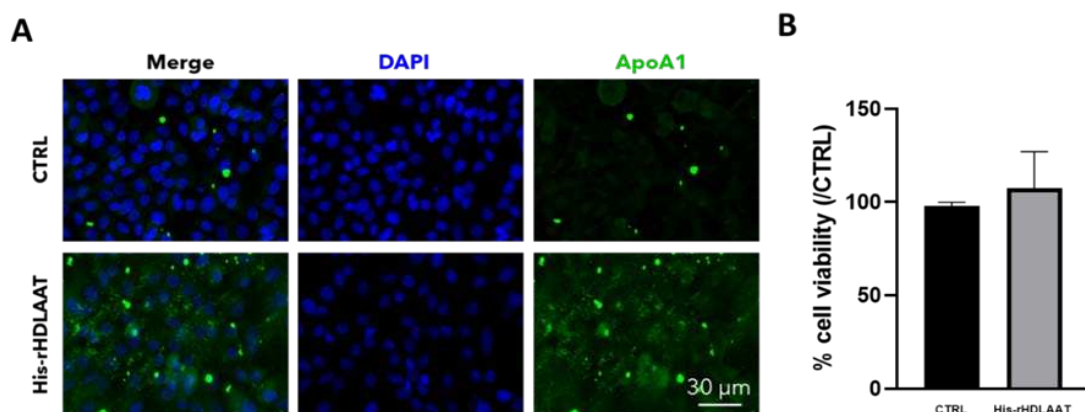


Figure 65 : Captation des nanoparticules de His-rHDLAAT par les cellules EA.hy926. A) Immunomarquage des cellules EA.hy926 après 6 heures d'incubation sans ou avec His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL). Un anticorps anti-ApoA-I humain a été utilisé pour cibler les His-rHDL_{AAT} (en vert) et les noyaux cellulaires ont été marqués avec du DAPI (en bleu). Barre d'échelle = 30 µm ; B) La viabilité a été déterminée par le test du rouge neutre et exprimée en pourcentage de viabilité par rapport à la condition contrôle (CTRL). Les cellules EA.hy926 ont été incubées sans ou avec His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) pendant 24 heures. Les données sont représentées en moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes (n = 3).

La présence de marquage vert dans les cellules EA.hy926 traitées avec His-rHDL_{AAT} montre que ces nanoparticules sont internalisées après 6 heures d'exposition. (Figure 65 A). Ce résultat nous indique que la présence d'AAT dans les nanoparticules ne semble pas affecter leur captation cellulaire. De la même manière, la présence d'AAT dans les nanoparticules n'affecte pas la viabilité des cellules endothéliales (Figure 65 B).

c. Les His-rHDL_{AAT} améliorent l'homéostasie des cellules endothéliales en présence de l'élastase

Pour confirmer la capacité protectrice des nanoparticules de His-rHDL_{AAT} vis-à-vis de l'élastase, nous avons suivi, par impédancemétrie, le comportement cellulaire des EA.hy926 en présence de différentes concentrations de cette protéase (100, 200, 400 et 800 nM) (Figure 66 A). Une diminution progressive de l'index cellulaire est observée en présence de l'élastase à partir de 200 nM. Cette diminution de l'index reflète la sénescence cellulaire des EA.hy926 qui apparaît plus rapidement avec des concentrations croissantes en élastase. Sur la base de ces résultats, deux concentrations en élastase ont été choisies (200 et 400 nM) pour évaluer la capacité protectrice des nanoparticules de His-rHDL_{AAT}. Pour les deux concentrations d'élastase utilisées, les nanoparticules retardent de 10 à 12 heures la diminution de l'index cellulaire et, par conséquent, le processus de mort cellulaire (Figure 66 B). Ces résultats montrent que l'AAT présente dans les nanoparticules a la capacité d'inhiber l'impact délétère de l'élastase sur l'homéostasie cellulaire.

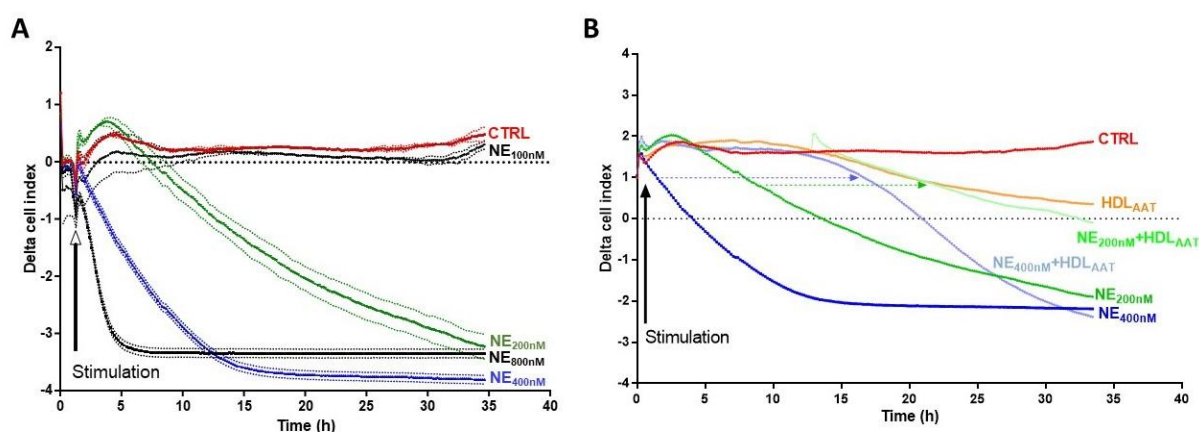


Figure 66 : Suivi en temps réel du comportement cellulaire EA.hy926 en réponse à l'élastase neutrophile (NE) en absence ou en présence de His-rHDL_{AAT}. A) Les cellules Ea.hy926 ont été traitées en absence (rouge) ou avec des concentrations croissantes d'élastase 800 nM (noir), 400 nM (bleu), 200 nM (vert) et 100 nM (gris). B) Les cellules Ea.hy926 ont été traitées avec 400 nM ou 200 nM de l'élastase neutrophile en absence ou en présence de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) ; Ctrl en rouge, rHDL_{AAT} en jaune, NE 200 nM en vert foncé, NE 400 nM en bleu foncé, NE 200 nM+rHDL_{AAT} en vert clair et NE 400 nM+rHDL_{AAT}; les indexs cellulaires ont été normalisés par rapport au début de la stimulation (comme indiqué par les flèches).

Cette capacité protectrice est confirmée dans la caractérisation morphologique des cellules en microscopie (Figure 67), ainsi que dans la détermination des cellules apoptotiques par la technique TUNEL (Figure 68).

Les images obtenues en microscopie à contraste de phase montrent qu'en présence de l'élastase seule, les cellules présentent un arrondissement voire un décollement reflétant un processus apoptotique avancé. Les mêmes caractéristiques sont observées pour les cellules co-incubées avec de l'élastase et des nanoparticules de His-rHDL, traduisant l'absence d'action inhibitrice de ces nanoparticules contre les effets protéolytiques délétères de l'élastase. Par contre, en présence de His-rHDL_{AAT} ou de l'AAT seule, mais également lors d'une co-incubation des His-rHDL_{AAT} ou de l'AAT seule avec de l'élastase, les EA.hy926 présentent la morphologie de cellules viables formant une monocouche cellulaire (Figure 67).

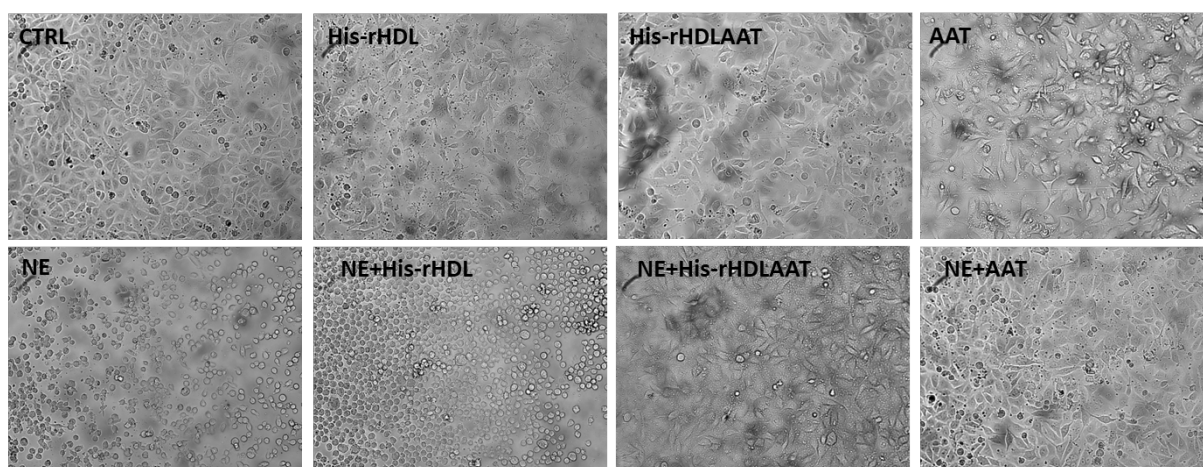


Figure 67 : Les nanoparticules de His-rHDLAAT protègent l'altération de la morphologie induite par l'élastase neutrophile. La morphologie des cellules EA.hy926 est affectée par l'élastase neutrophile (400 nM) après 6 heures d'incubation. Les nanoparticules de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) et l'AAT (0,15 mg/mL) protègent de l'altération de la morphologie cellulaire induite par l'élastase alors que les rHDL (0,4 mg/mL) ne le font pas.

Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par la technique TUNEL qui permet de détecter par fluorescence la fragmentation de l'ADN nucléaire des cellules apoptotiques. En effet, le marquage TUNEL (vert) de nombreuses cellules endothéliales, suite à une stimulation avec 400 nM d'élastase pendant 6 heures, est fortement diminué en présence de His-rHDL_{AAT} (Figure 68). Cette diminution correspond à un nombre moindre de cellules apoptotiques dans ces conditions.

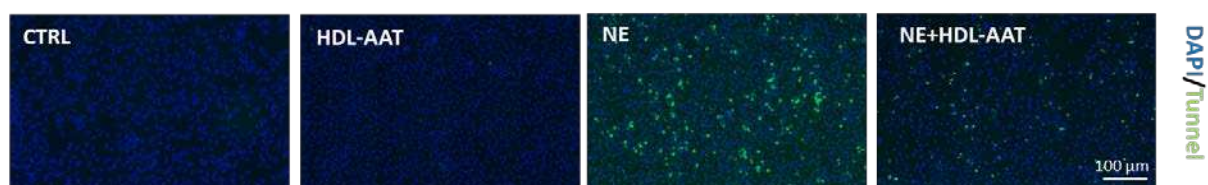


Figure 68 : Les nanoparticules de His-rHDLAAT limitent la fragmentation de l'ADN induite par l'élastase neutrophile. Analyse de la fragmentation de l'ADN par le test TUNEL dans les cellules EA.hy926 (vert). Les noyaux cellulaires sont colorés au DAPI (bleu). L'élastase augmente et les His-rHDL_{AAT} diminuent le nombre de cellules TUNEL positives. Les barres indiquent 100 μ m. (n = 2).

L'ensemble de ces résultats montre donc que les nanoparticules de His-rHDL_{AAT} induisent une protection efficace des cellules endothéliales contre les dommages causés par l'élastase et que cette capacité protectrice est imputable aux activités anti-élastase de l'AAT incorporée dans les nanoparticules.

d. Les His-rHDL_{AAT} présentent des propriétés anti-inflammatoires

Pour déterminer la capacité de nos nanoparticules enrichies à atténuer l'activation endothéliale induite par une cytokine pro-inflammatoire, les cellules EA.hy926 sont exposées au TNF α (5 ng/mL) en présence ou non des nanoparticules de His-rHDL ou de His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL). Les niveaux d'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et de la sécrétion de la cytokine IL-6 sont ensuite déterminées.

Ici, l'activation endothéliale, mise en évidence par l'augmentation marquée de l'expression de ICAM-1, est significativement diminuée pour les cellules stimulées pendant 6 heures avec les nanoparticules de His-rHDL, His-rHDL_{AAT} et avec l'AAT (Figure 69 A). De même, une exposition de 24 heures avec le TNF α induit une augmentation significative de la sécrétion d'IL-6. La réduction partielle de cette sécrétion lors d'une co-incubation avec les nanoparticules His-rHDL ou His-rHDL_{AAT} est significative mais n'apparaît pas significativement plus importante que celle induite par l'AAT seule (Figure 69 B).

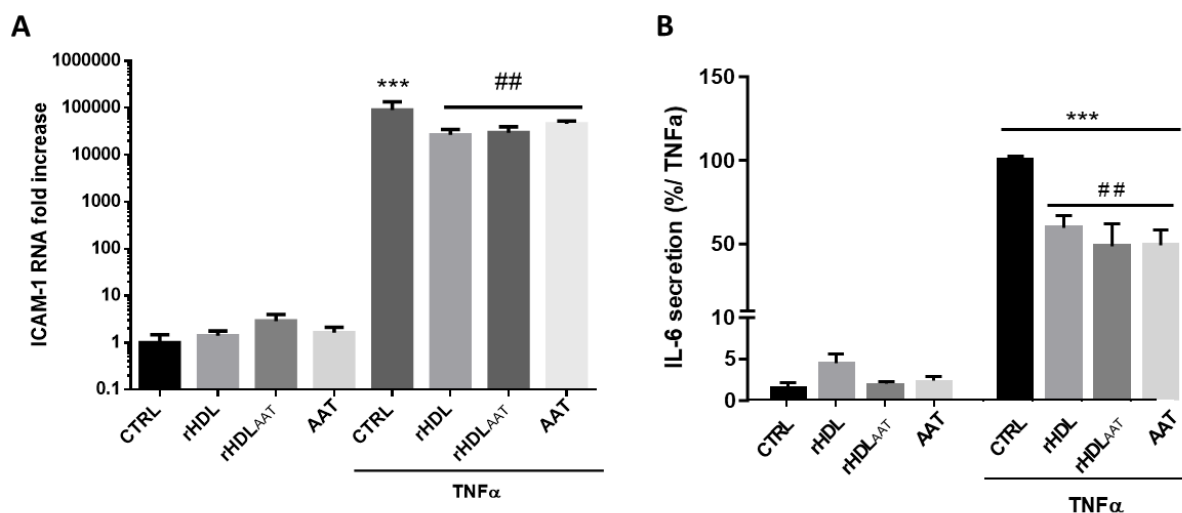


Figure 69 : His-rHDLAAT limite l'activation endothéliale et l'inflammation des cellules EA.hy926 induites par le TNF α . A) Les cellules EA.hy926 ont été exposées au TNF α (5 ng/mL) pendant 6 heures en absence ou en présence de His-rHDL (0,4 mg/mL), His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) ou AAT (0,15 mg/mL). Le niveau d'expression de l'ARN codant pour ICAM-1 a ensuite été quantifié. B) La sécrétion de IL-6 par les cellules EA.hy926 a été quantifiée par ELISA. Les cellules ont été préalablement co-incubées pendant 24 heures avec His-rHDL (0,4 mg/mL), His-rHDL_{AAT} (0,4 mg/mL) ou AAT (0,15 mg/ml) et TNF α (5 ng/mL). Les données sont représentées en moyenne $\pm$ SEM de trois expériences indépendantes ($n = 3$). *** $p > 0,005$ (vs condition CTRL); ## $p < 0,01$ (vs condition TNF α).

Tous ces résultats montrent que les propriétés anti-inflammatoires et endothélio-protectrices des nanoparticules ne sont pas impactées par l'enrichissement avec l'AAT mais elles ne sont pas non plus exacerbées.

IV. Discussion

Dans cette deuxième partie, nous avons pu développer un protocole d'enrichissement des nanoparticules avec de l'AAT et vérifier les propriétés protectrices des nanoparticules par le biais des tests anti-inflammatoires mais aussi par les tests d'inhibition de l'activité de l'élastase.

Après avoir effectué l'enrichissement des nanoparticules, nous avons optimisé la méthode de purification afin d'éliminer l'AAT en excès. Dans un premier temps, la reconstitution effectuée avec de l'ApoA-I sans l'étiquette histidine a pu aboutir à la formation de nanoparticules bien enrichies mais les méthodes de purification associées à ce type de nanoparticules ne sont pas avérées suffisamment efficaces pour éliminer totalement l'AAT résiduelle. La littérature mentionne que les principales méthodes de purification, suite à un enrichissement avec l'AAT, sont l'ultracentrifugation ou l'utilisation de filtres centrifuges qui permettent une ultrafiltration rapide (Moreno et al., 2014; S. M. Gordon et al., 2015). Dans cette étude, l'ultracentrifugation n'a pas permis d'obtenir des résultats convaincants pour obtenir un rendement élevé en nanoparticules enrichies dépourvues d'AAT libre. Concernant la chromatographie d'exclusion, la colonne la plus adaptée à cette purification (Superdex 200) n'a pas permis de récupérer la totalité des rHDL enrichies. La filtration à l'aide des tubes Amicon n'a pas été envisagée car cette méthode nous paraissait moins adaptée en raison des masses moléculaires proches entre l'AAT et l'ApoA-I.

Par conséquent, la production de nanoparticules enrichies avec de l'ApoA-I contenant l'étiquette histidine a été envisagée afin de pouvoir réaliser l'élimination de l'AAT libre par chromatographie d'affinité qui s'est avérée beaucoup efficace. Les résultats des Western Blot des nanoparticules purifiées par cette méthode ont permis de valider leur enrichissement avec un rendement d'enrichissement autour de 2 %, ce qui apparaît modeste au regard de la quantité d'AAT utilisée au départ. En effet, des études de protéomique ont mis en évidence la présence d'AAT dans les HDL circulantes (Ortiz-Muñoz et al., 2009; Moreno et al., 2014). Des études préliminaires effectuées au laboratoire par titration calorimétrique isotherme (ITC) suggéraient une affinité moyenne (de l'ordre de 10 à 100 μ M) entre l'AAT et des rHDL (CSL-111) (Gajahi Soudahome, 2018). La liaison de l'AAT aux HDL ne semble pas résulter d'une interaction directe avec l'ApoA-I car dans la littérature et les banques de données d'interactions de protéines, une seule étude de capture par affinité à haut débit suggère une interaction entre ces deux partenaires (Marcon et al., 2014). L'enrichissement de l'ordre de 2 % obtenu avec un mélange équimolaire d'ApoA-I et d'AAT appuie l'absence d'interaction ou une interaction très faible entre ces deux protéines et suggère que l'AAT se lie plutôt à d'autres protéines ou à des constituants lipidiques dans les HDL endogènes. Dans deux études similaires à la nôtre, l'enrichissement des nanoparticules a été effectué soit après la reconstitution des nanoparticules, soit

avec des HDL issues de plasma (Moreno et al., 2014; S. M. Gordon et al., 2015). Dans notre étude, nous avons privilégié l'enrichissement des rHDL en même temps que la procédure de reconstitution des nanoparticules en partant du principe que l'ApoA-I n'aurait pas d'affinité ou aurait une très faible affinité pour l'AAT. Cette méthode a donc été choisie afin d'optimiser au maximum l'intégration de l'AAT, qui est protéine relativement grosse, au sein de la nanoparticule.

Gordon et al. ont montré que l'AAT possède une région en forme de spirale aléatoire qui s'insère dans le feuillet externe d'une bicouche phospholipidique. Cette région hydrophobe correspond au site actif responsable de la capacité de cette protéine à inhiber l'activité protéolytique de l'élastase. Le retrait de cette région réduirait donc l'affinité pour les lipides (S. M. Gordon et al., 2015). Les données de cette étude suggèrent donc que le faible taux d'enrichissement observé précédemment serait lié à l'affinité de l'AAT pour le POPC et non pour l'ApoA-I. Une étude préliminaire effectuée au laboratoire (résultats non montrés) consistait à incuber une même quantité d'ApoA-I et d'AAT pendant une dizaine de minutes puis à effectuer une purification par chromatographie d'affinité. Le profil chromatographique obtenu a pu mettre en évidence que l'AAT était éluée indépendamment de l'ApoA-I, confirmant également l'absence d'affinité entre ces deux protéines. Par ailleurs, dans cette même étude de Gordon et al., il a été observé une réduction de l'inhibition de l'activité de l'élastase de cinq fois pour les rHDL enrichies en AAT par comparaison à l'AAT seule. Cette réduction de l'activité anti-élastase s'explique par le masquage du site actif dans les particules de HDL empêchant son interaction avec l'élastase. Dans notre étude, les nanoparticules de His-rHDL_{AAT} présentent une activité anti-élastase significative et globalement équivalente à celle de l'AAT seule. Cette différence de résultats par rapport à l'étude de Gordon et al. réside probablement dans le mode de préparation des rHDL enrichies. Dans leur étude, l'enrichissement se fait après la reconstitution des nanoparticules, tandis nous avons réalisé l'enrichissement pendant le processus de reconstitution, ce qui peut modifier la façon dont s'insère l'AAT dans la nanoparticule. Nos résultats suggèrent donc que l'enrichissement pendant la reconstitution des rHDL serait plus adapté afin de préserver l'activité de l'AAT, mais que cela ne permet pas d'obtenir des nanoparticules avec un effet synergique de l'ApoA-I et de l'AAT dans les propriétés anti-inflammatoires et endothélio-protectrices. Par conséquent, notre méthode d'enrichissement reste une piste à optimiser afin d'obtenir un taux d'enrichissement plus élevé.

Dans la première partie des résultats, le test de biodisponibilité des rHDL suite à une administration par aérosolisation a permis de montrer une captation pulmonaire rapide de nos nanoparticules. Ici, l'objectif de l'enrichissement des nanoparticules avec l'AAT est de pouvoir les utiliser *in fine* dans les traitements de pathologies, en particulier pulmonaires. Il serait donc pertinent de poursuivre ce travail avec un test de biodisponibilité des nanoparticules enrichies selon un protocole identique à celui utilisé

précédemment et d'évaluer ensuite leurs effets thérapeutiques sur des modèles *in vivo* de développement pathologique comme l'emphysème pulmonaire. En effet, les patients présentant un emphysème pulmonaire lié à une déficience en AAT sont traités par une infusion hebdomadaire d'AAT humaine purifiée qui est une méthode sûre. Cependant, seulement 2 % d'AAT atteignent le liquide de revêtement épithélial (Moreno et al., 2014; Abdulkarim & Craig, 2023). La mise en place d'une autre voie d'administration de l'AAT telle que l'aérosolisation pourrait permettre une meilleure biodisponibilité ainsi qu'une meilleure efficacité. En effet, l'aérosolisation est une voie d'administration qui permet de cibler le traitement directement au niveau de l'organe d'intérêt, c'est-à-dire le poumon, et ainsi de réduire les doses d'AAT requises. L'inhalation permettrait également de réduire les multiples injections par mois (Abdulkarim & Craig, 2023).

V. Conclusion

En conclusion, cette étude a permis dans un premier temps de montrer que les nanoparticules ont été enrichies avec l'utilisation des deux formes d'ApoA-I (avec et sans étiquette). A ce jour, la méthode de purification la plus efficace reste la chromatographie d'affinité, ce qui amène à reconstituer des nanoparticules avec la forme taguée de l'ApoA-I. Malgré un faible rendement, les nanoparticules enrichies ont montré des effets protecteurs que ce soit contre l'inflammation ou l'activité de l'élastase. Ces résultats permettent d'ouvrir une piste sur l'enrichissement des rHDL avec l'AAT qui demande encore de nombreuses optimisations notamment dans l'augmentation du taux d'enrichissement.



Discussion générale et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était de produire une nanoparticule mimant les HDL endogènes afin de développer un vecteur thérapeutique non toxique et fonctionnel pouvant être enrichi et utilisé dans de nombreuses pathologies.

La première étape de ce travail consistait à obtenir de grandes quantités d'ApoA-I recombinante, protéine majeure des HDL, afin de produire des rHDL fonctionnelles. Dans cette étude, la production d'ApoA-I recombinante a été effectuée au sein de la souche bactérienne *Clear coli*, qui est très peu utilisée dans la littérature. Cette souche bactérienne possède des LPS génétiquement modifiés qui n'induisent pas de réponses endotoxiques dans les cellules de mammifères. En effet, les LPS sont les constituants majeurs de la membrane des bactéries à Gram négatif telles que *E. coli*. Les LPS induisent alors une réponse pro-inflammatoire chez l'humain, même à faible dose. Les protéines produites chez *E.coli* sont souvent contaminées par des LPS et nécessitent donc des étapes supplémentaires de pasteurisation. L'utilisation de la souche *Clear coli* semble alors être une solution afin de s'affranchir de nombreuses étapes de pasteurisation. De plus, l'utilisation de bactéries comme vecteur d'expression présente de nombreux avantages. Elles sont facilement manipulables, ont une croissance rapide et des rendements d'expression élevés, et ne nécessitent que des composants nécessaires à leur culture qui sont peu coûteux (Abinaya & Viswanathan, 2021).

Cependant, l'absence de réponse endotoxique par les bactéries *Clear coli* n'est pas suffisante pour obtenir des protéines recombinantes totalement sûres. En effet, des tests effectués au sein du laboratoire sur des échantillons d'ApoA-I recombinante produits chez *Clear coli* ont montré la présence d'ADN bactérien, ce qui pourrait expliquer la différence de répétabilité observée entre différents tests des propriétés protectrices (anti-inflammatoire, cytotoxicité...). Il serait donc intéressant de tester un autre système d'expression pour l'ApoA-I recombinante.

Il existe dans la littérature, de nombreux systèmes d'expression pour les protéines recombinantes (levure, bactérie, ...). Parmi ces systèmes d'expression, la production de protéines recombinantes au sein de microalgues serait une alternative très prometteuse. En effet, la plupart des protéines recombinantes pour un usage chez l'Homme nécessitent des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation ou la formation de ponts disulfures (Banerjee & Ward, 2022). En tant que système eucaryote, les microalgues peuvent effectuer des modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation, qui sont souvent nécessaires à la fonctionnalité des protéines. De plus, elles possèdent les protéines chaperons et la machinerie cellulaire nécessaires au repliement de la protéine humaine et sont exemptes de toxines (Specht et al., 2010). Les microalgues ont un temps de doublement relativement rapide (5 à 24 heures) et sont peu coûteuses à cultiver (Gong et al., 2011; Banerjee & Ward, 2022).

La présence de l'étiquette histidine au niveau de la protéine recombinante présente des avantages et des inconvénients. L'étiquette histidine permet de faciliter la purification après récupération au sein de la bactérie. Dans le cadre thérapeutique, la présence de l'étiquette pourrait être un avantage car elle permettrait de charger des miARN afin de les vectoriser et de les délivrer de façon efficace (Kasina et al., 2023). Lors de ce travail de thèse, nous avons rencontré des difficultés lors du clivage de l'étiquette histidine. Pour pallier ce problème, l'utilisation d'une étiquette auto-clivable pourrait être intéressante (Frankel et al., 2021).

La méthode de production des HDL reconstituées que nous avons privilégiée est la dialyse du cholate de sodium qui est la méthode la plus utilisée dans la littérature. Cependant, cette méthode reste complexe, laborieuse et chronophage, nécessitant plus de 24 heures de production. Une méthode alternative est la microfluidique, qui permet de produire plus rapidement les rHDL à plus grande échelle et en continu avec des nanoparticules de taille homogène (Y. Kim et al., 2013). Elle permet également une bonne reproductibilité, avec un rendement élevé tout en réduisant le nombre d'étapes de production. Cette méthode permettrait également d'effectuer des enrichissements lors de la production de nanoparticules (Y. Kim et al., 2013).

Nos nanoparticules ont ensuite été enrichies avec de l'AAT, une molécule de haut poids moléculaire. Malgré le faible rendement d'enrichissement, les rHDL présentent des effets anti-inflammatoires et anti-élastase significatifs, ce qui incite à optimiser le mode d'enrichissement afin d'obtenir des rendements plus élevés. Dans cette perspective, plusieurs pistes pourraient être explorées. En se basant sur le fait que l'étiquette N-terminale n'altère pas les propriétés protectrices des His-rHDL produites dans notre étude, il pourrait être envisageable de produire une protéine de fusion entre l'AAT et l'ApoA-I, reliées par un linker flexible, et qui nous assurerait une équimolarité des deux protéines dans les nanoparticules reconstituées. Toutefois, l'AAT étant glycosylée dans sa forme mature, l'expression ne pourrait pas être effectuée dans *E. coli* mais plutôt dans des microalgues.

Une autre alternative envisagée pour pallier ce problème de rendement est l'utilisation d'un analogue de l'AAT dans l'enrichissement des nanoparticules. Une étude préliminaire a été mise en place afin de répondre à cet objectif. Cette étude consiste à utiliser le Sivelestat, une molécule hydrophile utilisée dans le traitement de l'insuffisance respiratoire aiguë, et qui est un analogue de l'AAT dans la mesure où elle peut inhiber également l'activité de l'élastase produite par les neutrophiles.

Afin de pouvoir faciliter son insertion au sein des rHDL sans impacter la capacité inhibitrice de l'élastase, il est nécessaire d'effectuer un couplage peptidique entre le Sivelestat et une molécule hydrophobe, l'octadécylamine qui est une amine aliphatique primaire à 18 carbones très utilisée en

nanomédecine (Figure 70). Ce couplage peptidique permet d'obtenir une molécule active et hydrophobe.

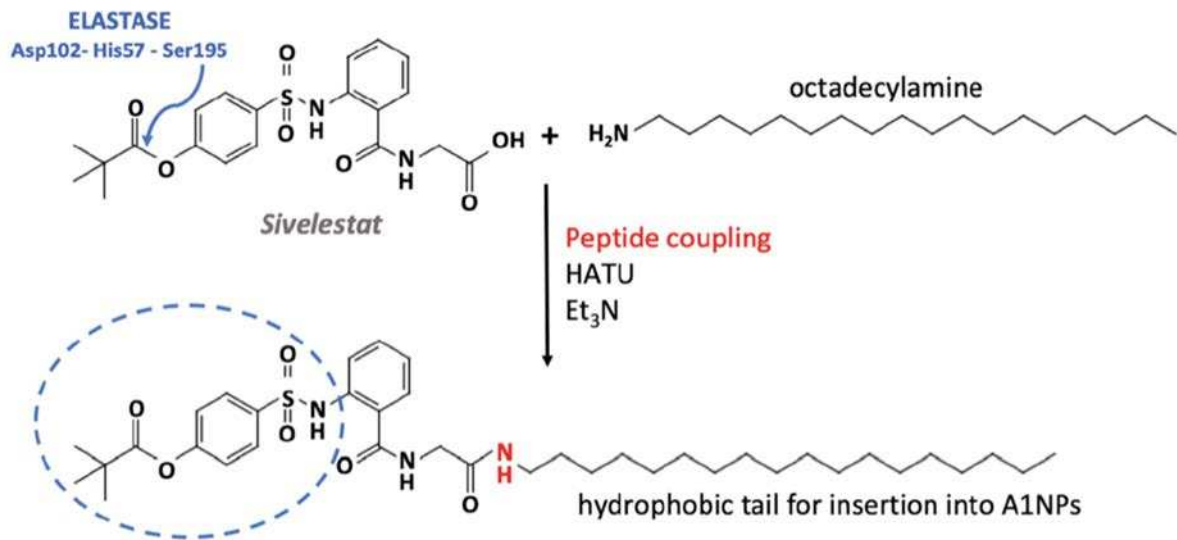


Figure 70 : Principe du couplage peptidique entre l'octadecylamine et le Sivelestat. La partie entourée en pointillé correspond à la zone d'interaction avec l'élastase.

Hormis l'AAT, l'élastase a de nombreux autres inhibiteurs tels que l'inhibiteur de la trypsine urinaire, dérivé de l'urine humaine, et l'ONO-5046, un inhibiteur synthétique. Ces deux inhibiteurs neutralisent l'activité de l'élastase sécrétée par les neutrophiles, et agissent sur les neutrophiles eux-mêmes pour réduire la production et la sécrétion de l'élastase, ce qui les rend efficaces contre les lésions pulmonaires induites par l'élastase (Nakatani et al., 2001).



Références bibliographiques

A

- Abdulkarim, A., & Craig, T. J. (2023). Alpha 1 Antitrypsin Mutation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482180/>
- Abinaya, R. V., & Viswanathan, P. (2021). Biotechnology-based therapeutics. In *Translational Biotechnology* (p. 27-52). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821972-0.00019-8>
- ACCORD Study Group, Ginsberg, H. N., Elam, M. B., Lovato, L. C., Crouse, J. R., Leiter, L. A., Linz, P., Friedewald, W. T., Buse, J. B., Gerstein, H. C., Probstfield, J., Grimm, R. H., Ismail-Beigi, F., Bigger, J. T., Goff, D. C., Cushman, W. C., Simons-Morton, D. G., & Byington, R. P. (2010). Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 362(17), 1563-1574. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001282>
- Agassandian, M., & Mallampalli, R. K. (2013). Surfactant phospholipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(3), 612-625.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.010>
- Aghasafari, P., George, U., & Pidaparti, R. (2019). A review of inflammatory mechanism in airway diseases. *Inflammation Research*, 68(1), 59-74. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1191-2>
- Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M., & Murthy, H. M. K. (2006). Crystal structure of human apolipoprotein A-I : Insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2126-2131. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506877103>
- Aldridge, W. N. (1953). Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal*, 53(1), 117-124.
- Allan, C. M., & Taylor, J. M. (1996). Expression of a novel human apolipoprotein (apoC-IV) causes hypertriglyceridemia in transgenic mice. *Journal of Lipid Research*, 37(7), 1510-1518.

- Allard, B., Panariti, A., & Martin, J. G. (2018). Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1777. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01777>
- Allen, R. M., Zhao, S., Ramirez Solano, M. A., Zhu, W., Michell, D. L., Wang, Y., Shyr, Y., Sethupathy, P., Linton, M. F., Graf, G. A., Sheng, Q., & Vickers, K. C. (2018). Bioinformatic analysis of endogenous and exogenous small RNAs on lipoproteins. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1506198. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1506198>
- Annema, W., Gawinecka, J., Muendlein, A., Saely, C. H., Drexel, H., & Eckardstein, A. von. (2022). Elevated levels of apolipoprotein D predict poor outcome in patients with suspected or established coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 341, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.12.011>
- Assmann, G., & Gotto, A. M. (2004). HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation*, 109(23_suppl_1), III-8. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000131512.50667.46>
- Assmann, G., & Schulte, H. (1988). The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) study : Prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *American Heart Journal*, 116(6 Pt 2), 1713-1724. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(88\)90220-7](https://doi.org/10.1016/0002-8703(88)90220-7)
- Assmann, G., Schulte, H., von Eckardstein, A., & Huang, Y. (1996). High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, 124, S11-S20. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(96\)05852-2](https://doi.org/10.1016/0021-9150(96)05852-2)

B

- Bailey, D., Jahagirdar, R., Gordon, A., Hafiane, A., Campbell, S., Chatur, S., Wagner, G. S., Hansen, H. C., Chiacchia, F. S., Johansson, J., Krimbou, L., Wong, N. C. W., & Genest, J. (2010). RVX-208 : A Small Molecule That Increases Apolipoprotein A-I and High-Density Lipoprotein Cholesterol In

- Vitro and In Vivo. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(23), 2580-2589.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.02.035>
- Banerjee, A., & Ward, V. (2022). Production of recombinant and therapeutic proteins in microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, 78, 102784. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102784>
- Barter, P. J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S. M., Kastelein, J. J. P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.-C., Waters, D. D., Shear, C. L., Revkin, J. H., Buhr, K. A., Fisher, M. R., Tall, A. R., & Brewer, B. (2007). Effects of Torcetrapib in Patients at High Risk for Coronary Events. *New England Journal of Medicine*, 357(21), 2109-2122.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706628>
- Barter Philip J., Nicholls Stephen, Rye Kerry-Anne, Anantharamaiah G.M., Navab Mohamad, & Fogelman Alan M. (2004). Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research*, 95(8), 764-772. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000146094.59640.13>
- Bates, S. R., Tao, J.-Q., Yu, K. J., Borok, Z., Crandall, E. D., Collins, H. L., & Rothblat, G. H. (2008). Expression and Biological Activity of ABCA1 in Alveolar Epithelial Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(3), 283-292. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0020OC>
- Ben-Aicha, S., Badimon, L., & Vilahur, G. (2020). Advances in HDL : Much More than Lipid Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), Article 3.
<https://doi.org/10.3390/ijms21030732>
- Berg, K. (1963). A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN—THE Lp SYSTEM. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 59(3), 369-382. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1963.tb01808.x>
- Berthier, J. (2013). From Microfluidics for Biotechnology to Biomicrofluidics. In *Technical Proceedings of the 2013 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2013* (Vol. 2).

- Bhale, A. S., & Venkataraman, K. (2022). Leveraging knowledge of HDLs major protein ApoA1 : Structure, function, mutations, and potential therapeutics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 154, 113634. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113634>
- Bibow, S., Polyhach, Y., Eichmann, C., Chi, C. N., Kowal, J., Albiez, S., McLeod, R. A., Stahlberg, H., Jeschke, G., Güntert, P., & Riek, R. (2017). Solution structure of discoidal high-density lipoprotein particles with a shortened apolipoprotein A-I. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(2), 187-193. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3345>
- Bielicki, J. K., & Oda, M. N. (2002). Apolipoprotein A-I^{Milano} and Apolipoprotein A-I^{Paris} Exhibit an Antioxidant Activity Distinct from That of Wild-Type Apolipoprotein A-I[†]. *Biochemistry*, 41(6), 2089-2096. <https://doi.org/10.1021/bi011716p>
- Birjmohun, R. S., Hutten, B. A., Kastelein, J. J. P., & Stroes, E. S. G. (2005). Efficacy and safety of high-density lipoprotein cholesterol-increasing compounds. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(2), 185-197. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.10.031>
- Bisgaier, C. L., Ackermann, R., Rea, T., Rodriguez, W. V., & Hartman, D. (2016). ApoA-IMilano phospholipid complex (ETC-216) infusion in human volunteers. Insights into the phenotypic characteristics of ApoA-IMilano carriers. *Pharmacological Research*, 111, 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.001>
- Bittar, R., Pierrat, G., Koujah, N., Poignon, C., Cherfils, C., Fesel-Fouquier, V., Barbot-Trystram, L., & Bonnefont-Rousselot, D. (2020). Electrophoresis of serum lipoproteins (lipoproteinogram) with the Hydragel Lipo + Lp(a)[®] (Sebia) kit : Evaluation of Fat Red 7B staining. *Annales de Biologie Clinique*, 78(1), 17-26. <https://doi.org/10.1684/abc.2019.1510>
- Björkerud, S., & Björkerud, B. (1994). Lipoproteins are major and primary mitogens and growth promoters for human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts in vitro. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, 14(2), 288-298. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.14.2.288>

- Bonizzi, A., Piuri, G., Corsi, F., Cazzola, R., & Mazzucchelli, S. (2021). HDL Dysfunctionality : Clinical Relevance of Quality Rather Than Quantity. *Biomedicines*, 9(7), 729.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9070729>
- Bonomo, E. A., & Swaney, J. B. (1990). Effect of phosphatidylethanolamine on the properties of phospholipid-apolipoprotein complexes. *Biochemistry*, 29(21), 5094-5103.
<https://doi.org/10.1021/bi00473a014>
- Borhani, D. W., Rogers, D. P., Engler, J. A., & Brouillette, C. G. (1997). Crystal structure of truncated human apolipoprotein A-I suggests a lipid-bound conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(23), 12291-12296.
- Bowman, L., Hopewell, J. C., Chen, F., Wallendszus, K., & Stevens, W. (2018). Effects of Anacetrapib in Patients With Atherosclerotic Vascular Disease. *Journal of Vascular Surgery*, 67(1), 356.
<https://doi.org/10.1016/j.jvs.2017.11.029>
- Bowry, V., Stanley, K., & Stocker, R. (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10316-10320. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10316>
- Bragheri, F., Martínez Vázquez, R., & Osellame, R. (2020). Microfluidics. In *Three-Dimensional Microfabrication Using Two-Photon Polymerization* (p. 493-526). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817827-0.00057-6>
- Brewer, H. B., Fairwell, T., LaRue, A., Ronan, R., Houser, A., & Bronzert, T. J. (1978). The amino acid sequence of human Apoa-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80(3), 623-630.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91614-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91614-5)
- Brinkman, J. E., & Sharma, S. (2023). Physiology, Pulmonary. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482426/>
- Brouillette, C. G., Anantharamaiah, G. M., Engler, J. A., & Borhani, D. W. (2001). Structural models of human apolipoprotein A-I : A critical analysis and review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*

- *Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1531(1), 4-46. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00081-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00081-6)

Bruckert, E., von Eckardstein, A., Funke, H., Beucler, I., Wiebusch, H., Turpin, G., & Assmann, G. (1997). The replacement of arginine by cysteine at residue 151 in Apolipoprotein A-I produces a phenotype similar to that of Apolipoprotein A-IMilano. *Atherosclerosis*, 128(1), 121-128. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(96\)05982-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(96)05982-5)

C

Calzada, E., Onguka, O., & Claypool, S. M. (2016). Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. *International review of cell and molecular biology*, 321, 29-88. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.10.001>

Camont, L., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2011). Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), 594-603. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.05.013>

Camont, L., Lhomme, M., Rached, F., Le Goff, W., Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., Calzada, C., Lagarde, M., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2013). Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: Relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(12), 2715-2723. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301468>

Cannon, C. P., Shah, S., Dansky, H. M., Davidson, M., Brinton, E. A., Gotto, A. M., Stepanavage, M., Liu, S. X., Gibbons, P., Ashraf, T. B., Zafarino, J., Mitchel, Y., & Barter, P. (2010). Safety of Anacetrapib in Patients with or at High Risk for Coronary Heart Disease. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2406-2415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009744>

Castellani, L. W., & Lusis, A. J. (2001). ApoA-II Versus ApoA-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(12), 1870-1872. <https://doi.org/10.1161/atvb.21.12.1870>

- Castelli, W. P., Anderson, K., Wilson, P. W. F., & Levy, D. (1992). Lipids and risk of coronary heart disease The Framingham Study. *Annals of Epidemiology*, 2(1), 23-28. [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(92\)90033-M](https://doi.org/10.1016/1047-2797(92)90033-M)
- Castelli, W. P., Garrison, R. J., Wilson, P. W. F., Abbott, R. D., Kalousdian, S., & Kannel, W. B. (1986). Incidence of Coronary Heart Disease and Lipoprotein Cholesterol Levels : The Framingham Study. *JAMA*, 256(20), 2835-2838. <https://doi.org/10.1001/jama.1986.03380200073024>
- Castillo, R. I., Rojo, L. E., Henriquez-Henriquez, M., Silva, H., Maturana, A., Villar, M. J., Fuentes, M., & Gaspar, P. A. (2016). From Molecules to the Clinic : Linking Schizophrenia and Metabolic Syndrome through Sphingolipids Metabolism. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00488>
- Chai, A. B., Ammit, A. J., & Gelissen, I. C. (2017). Examining the role of ABC lipid transporters in pulmonary lipid homeostasis and inflammation. *Respiratory Research*, 18, 41. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0526-9>
- Cheung, M. C., & Albers, J. J. (1982). Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition : Particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *Journal of Lipid Research*, 23(5), 747-753. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38108-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38108-6)
- Cho, K. H., Park, S. H., Han, J. M., Kim, H. C., Choi, Y. K., & Choi, I. (2006). ApoA-I mutants V156K and R173C promote anti-inflammatory function and antioxidant activities. *European Journal of Clinical Investigation*, 36(12), 875-882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2006.01737.x>
- Cho, K.-H. (2022). Human Serum Amyloid a Impaired Structural Stability of High-Density Lipoproteins (HDL) and Apolipoprotein (Apo) A-I and Exacerbated Glycation Susceptibility of ApoA-I and HDL. *Molecules*, 27(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/molecules27134255>
- Cho, K.-H., & Kim, J.-R. (2009). A reconstituted HDL containing V156K or R173C apoA-I exhibited anti-inflammatory activity in apo-E deficient mice and showed resistance to myeloperoxidase-mediated oxidation. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(6), Article 6. <https://doi.org/10.3858/emm.2009.41.6.047>

- Cho, K.-H., Park, S.-H., Han, J.-M., Kim, H.-C., Chung, Y.-J., Choi, I., & Kim, J.-R. (2007). A point mutant of apolipoprotein A-I, V156K, exhibited potent anti-oxidant and anti-atherosclerotic activity in hypercholesterolemic C57BL/6 mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 39(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.18>
- Chowaniec, Z., & Skoczyńska, A. (2018). Plasma lipid transfer proteins : The role of PLTP and CETP in atherogenesis. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(3), 429-436. <https://doi.org/10.17219/acem/67968>
- Christoffersen, C. (2021). Apolipoprotein M—A Marker or an Active Player in Type II Diabetes? *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.665393>
- Clark, R. W., Ruggeri, R. B., Cunningham, D., & Bamberger, M. J. (2006). Description of the torcetrapib series of cholesteryl ester transfer protein inhibitors, including mechanism of action. *Journal of Lipid Research*, 47(3), 537-552. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500349-JLR200>
- Cohn, E. J., Gurd, F. R. N., Barnes, B. A., Kahnt, F. W., & Uroma, E. (1950). *A System for the Separation of the Components of Human Blood : Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma*. Lab, c. 72.
- Cole, L. K., Vance, J. E., & Vance, D. E. (2012). Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 754-761. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.009>
- Collins, M. K. L., Perkins, G. R., Rodriguez-Tarduchy, G., Nieto, M. A., & López-Rivas, A. (1994). Growth factors as survival factors : Regulation of apoptosis: Growth Factors as Survival Factors. *BioEssays*, 16(2), 133-138. <https://doi.org/10.1002/bies.950160210>
- Cooke, A. L., Morris, J., Melchior, J. T., Street, S. E., Jerome, W. G., Huang, R., Herr, A. B., Smith, L. E., Segrest, J. P., Remaley, A. T., Shah, A. S., Thompson, T. B., & Davidson, W. S. (2018). A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL[S]. *Journal of Lipid Research*, 59(7), 1244-1255. <https://doi.org/10.1194/jlr.M085332>

- Cormode, D. P., Skajaa, T., van Schooneveld, M. M., Koole, R., Jarzyna, P., Lobatto, M. E., Calcagno, C., Barazza, A., Gordon, R. E., Zanzonico, P., Fisher, E. A., Fayad, Z. A., & Mulder, W. J. M. (2008). Nanocrystal Core High-Density Lipoproteins : A Multimodality Contrast Agent Platform. *Nano Letters*, 8(11), 3715-3723. <https://doi.org/10.1021/nl801958b>
- Counsell, R. E., & Pohland, R. C. (1982). Lipoproteins as potential site-specific delivery systems for diagnostic and therapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 25(10), 1115-1120. <https://doi.org/10.1021/jm00352a001>
- Cuesta Torres, L. F., Zhu, W., Öhrling, G., Larsson, R., Patel, M., Wiese, C. B., Rye, K.-A., Vickers, K. C., & Tabet, F. (2019). High-density lipoproteins induce miR-223–3p biogenesis and export from myeloid cells : Role of scavenger receptor BI-mediated lipid transfer. *Atherosclerosis*, 286, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.04.227>

D

- Dahlbäck, B., Ahnström, J., Christoffersen, C., & Nielsen, L. B. (2008). Apolipoprotein M : Structure and function. *Future Lipidology*, 3(5), 495-503. <https://doi.org/10.2217/17460875.3.5.495>
- Dallinga-Thie, G. M., Franssen, R., Mooij, H. L., Visser, M. E., Hassing, H. C., Peelman, F., Kastelein, J. J. P., Péterfy, M., & Nieuwdorp, M. (2010). THE METABOLISM OF TRIGLYCERIDE-RICH LIPOPROTEINS REVISITED; NEW PLAYERS, NEW INSIGHT. *Atherosclerosis*, 211(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.027>
- Darabi, M., Guillas-Baudouin, I., Le Goff, W., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2016). Therapeutic applications of reconstituted HDL : When structure meets function. *Pharmacology & Therapeutics*, 157, 28-42. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.010>
- Dassati, S., Waldner, A., & Schweigreiter, R. (2014). Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiology of Aging*, 35(7), 1632-1642. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.148>

- Davidson, W. S., Shah, A. S., Sexmith, H., & Gordon, S. M. (2022). The HDL Proteome Watch : Compilation of studies leads to new insights on HDL function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(2), 159072. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159072>
- Davidson, W. S., Silva, R. A. G. D., Chantepie, S., Lagor, W. R., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2009). Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters : Relevance to antioxidative function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(6), 870-876. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186031>
- Davidson, W. S., & Thompson, T. B. (2007). The Structure of Apolipoprotein A-I in High Density Lipoproteins *. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22249-22253. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700014200>
- De Nardo, D., Labzin, L. I., Kono, H., Seki, R., Schmidt, S. V., Beyer, M., Xu, D., Zimmer, S., Lahrmann, C., Schildberg, F. A., Vogelhuber, J., Kraut, M., Ulas, T., Kerksiek, A., Krebs, W., Bode, N., Grebe, A., Fitzgerald, M. L., Hernandez, N. J., ... Latz, E. (2014). High-density lipoprotein mediates anti-inflammatory reprogramming of macrophages via the transcriptional regulator ATF3. *Nature Immunology*, 15(2), 152-160. <https://doi.org/10.1038/ni.2784>
- Deepthi, S. (2018, décembre 13). *Classifying Lipoproteins : Types and Methodologies*. News-Medical.net. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Lipoprotein-Classification.aspx>
- Del Giudice, R., Domingo-Espín, J., Iacobucci, I., Nilsson, O., Monti, M., Monti, D. M., & Lagerstedt, J. O. (2017). Structural determinants in ApoA-I amyloidogenic variants explain improved cholesterol metabolism despite low HDL levels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(12), 3038-3048. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.001>
- Delbosc, S., Rouer, M., Alsac, J.-M., Louedec, L., Al Shoukr, F., Rouzet, F., Michel, J.-B., & Meilhac, O. (2016). High-density lipoprotein therapy inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced abdominal

aortic aneurysm progression. *Thrombosis and Haemostasis*, 115(4), 789-799.

<https://doi.org/10.1160/TH15-05-0398>

Di Bartolo, B. A., Scherer, D. J., & Nicholls, S. J. (2016). Inducing apolipoprotein A-I synthesis to reduce cardiovascular risk : From ASSERT to SUSTAIN and beyond. *Archives of Medical Science : AMS*, 12(6), 1302-1307. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.62906>

Didichenko Svetlana A., Navdaev Alexei V., Cukier Alexandre M.O., Gille Andreas, Schuetz Patrick, Spycher Martin O., Thérond Patrice, Chapman M. John, Kontush Anatol, & Wright Samuel D. (2016). Enhanced HDL Functionality in Small HDL Species Produced Upon Remodeling of HDL by Reconstituted HDL, CSL112. *Circulation Research*, 119(6), 751-763. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308685>

Ducroux, C., Desilles, J.-P., Mawhin, M.-A., Delbosc, S., Ho-Tin-Noé, B., Ollivier, V., Di Meglio, L., Lapergue, B., Michel, J.-B., & Amarenco, P. (2020). Protective Effect of ApoA1 (Apolipoprotein A1)-Milano in a Rat Model of Large Vessel Occlusion Stroke. *Stroke*, 51(6), 1886-1890. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.119.027898>

E

Easton, R., Gille, A., D'Andrea, D., Davis, R., Wright, S. D., & Shear, C. (2014). A multiple ascending dose study of CSL112, an infused formulation of ApoA-I : The Journal of Clinical Pharmacology. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 54(3), 301-310. <https://doi.org/10.1002/jcph.194>

Efrat, M., & Aviram, M. (2010). Paraoxonase 1 interactions with HDL, antioxidants and macrophages regulate atherogenesis—A protective role for HDL phospholipids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 660, 153-166. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-350-3_14

Engelking, L. R. (2015). Chapter 59—Sphingolipids. In L. R. Engelking (Éd.), *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)* (p. 378-383). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50059-1>

F

- Fasano, C., Hiol, A., Miolan, J.-P., & Niel, J.-P. (2006). Les sphingolipides : Vecteurs d'agents pathogènes et cause de maladies génétiques. *médecine/sciences*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006224411>
- Fatkullina, A. R., Peshkova, I. O., & Koltsova, E. K. (2016). The role of cytokines in the development of atherosclerosis. *Biochemistry (Moscow)*, 81(11), 1358-1370. <https://doi.org/10.1134/S0006297916110134>
- Fear, G., Komarnytsky, S., & Raskin, I. (2007). Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 354-368. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.09.001>
- Feingold, K. R. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Éds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- Feng, M., Cai, Q., Song, D., Dong, J., & Zhou, P. (2006). High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 46(2), 337-342. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.11.009>
- Ference, B. A., Kastelein, J. J. P., Ginsberg, H. N., Chapman, M. J., Nicholls, S. J., Ray, K. K., Packard, C. J., Laufs, U., Brook, R. D., Oliver-Williams, C., Butterworth, A. S., Danesh, J., Smith, G. D., Catapano, A. L., & Sabatine, M. S. (2017). Association of Genetic Variants Related to CETP Inhibitors and Statins With Lipoprotein Levels and Cardiovascular Risk. *JAMA*, 318(10), 947-956. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.11467>
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Moroni, C., Savino, S., Liuzzi, A., Balzola, F., & Bicchiega, V. (2005). Paraoxonase Activity in High-Density Lipoproteins : A Comparison between Healthy and Obese

- Females. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(3), 1728-1733.
<https://doi.org/10.1210/jc.2004-0486>
- Fielding, C. J., & Fielding, P. E. (1995). Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, 36(2), 211-228.
- Fisher, E. A., Feig, J. E., Hewing, B., Hazen, S. L., & Smith, J. D. (2012). High-Density Lipoprotein Function, Dysfunction, and Reverse Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 2813-2820. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300133>
- Florea, G., Tudorache, I. F., Fuior, E. V., Ionita, R., Dumitrescu, M., Fenyo, I. M., Bivol, V. G., & Gafencu, A. V. (2022). Apolipoprotein A-II, a Player in Multiple Processes and Diseases. *Biomedicines*, 10(7), 1578. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071578>
- Forte, T. M., Nichols, A. V., Gong, E. L., Lux, S., & Levy, R. I. (1971). Electron microscopic study on reassembly of plasma high density apoprotein with various lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 248(2), 381-386. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(71\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(71)90026-9)
- Fournier, N., Paul, J.-L., Atger, V., Cogny, A., Soni, T., de la Llera-Moya, M., Rothblat, G., & Moatti, N. (1997). HDL Phospholipid Content and Composition as a Major Factor Determining Cholesterol Efflux Capacity From Fu5AH Cells to Human Serum. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(11), 2685-2691. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.11.2685>
- Franceschini, G., Sirtori, C. R., Capurso 2nd, A., Weisgraber, K. H., & Mahley, R. W. (1980, novembre 1). *A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family*. American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI109956>
- Franceschini, G., Tosi, C., Moreno, Y., & Sirtori, C. R. (1985). Effects of storage on the distribution of high density lipoprotein subfractions in human sera. *Journal of Lipid Research*, 26(11), 1368-1373. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34264-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34264-4)

- Frank, P. G., & Marcel, Y. L. (2000). Apolipoprotein A-I : Structure–function relationships. *Journal of Lipid Research*, 41(6), 853-872. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32028-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32028-9)
- Frankel, R., Bernfur, K., Sparr, E., & Linse, S. (2021). Purification and HDL-like particle formation of apolipoprotein A-I after co-expression with the EDDIE mutant of Npro autoprotease. *Protein Expression and Purification*, 187, 105946. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105946>
- Franks, T. J., Colby, T. V., Travis, W. D., Tudor, R. M., Reynolds, H. Y., Brody, A. R., Cardoso, W. V., Crystal, R. G., Drake, C. J., Engelhardt, J., Frid, M., Herzog, E., Mason, R., Phan, S. H., Randell, S. H., Rose, M. C., Stevens, T., Serge, J., Sunday, M. E., ... Williams, M. C. (2008). Resident Cellular Components of the Human Lung. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(7), 763-766. <https://doi.org/10.1513/pats.200803-025HR>
- Fregonese, L., & Stolk, J. (2008). Hereditary alpha-1-antitrypsin deficiency and its clinical consequences. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 3(1), 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-16>
- Fukuda, R., Saito, M., Shibukawa, S., Sumino, A., Nakano, M., & Murakami, T. (2020). Urea-Assisted Reconstitution of Discoidal High-Density Lipoprotein. *Biochemistry*, 59(15), 1455-1464. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00075>

G

- G., A. G., Kamalanathan, A. S., Vijayalakshmi, M. A., & Venkataraman, K. (2018). Efficient purification of Apolipoprotein A1 (ApoA1) from plasma by HEA HyperCel™ : An alternative approach. *Journal of Chromatography B*, 1073, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.12.016>
- Gajahi Soudahome, A. (2018). *Etude des effets de la glycation sur les interactions protéine-ligand dans le cadre du diabète et de l'athérosclérose : La liaison entre l'albumine et le liraglutide et entre l'apolipoprotéine A1 et ses partenaires de liaison* [PhD].
- Ganesan, S., Comstock, A. T., & Sajjan, U. S. (2013). Barrier function of airway tract epithelium. *Tissue Barriers*, 1(4), e24997. <https://doi.org/10.4161/tisb.24997>

- Gao, X., Yuan, S., Jayaraman, S., & Gursky, O. (2012). Role of Apolipoprotein A-II in the Structure and Remodeling of Human High-Density Lipoprotein (HDL) : Protein Conformational Ensemble on HDL. *Biochemistry*, 51(23), 4633-4641. <https://doi.org/10.1021/bi300555d>
- Garg, A., & Lee, J. C.-Y. (2022). Vitamin E : Where Are We Now in Vascular Diseases? *Life*, 12(2), 310. <https://doi.org/10.3390/life12020310>
- Garner, B., Waldeck, A. R., Witting, P. K., Rye, K.-A., & Stocker, R. (1998). Oxidation of High Density Lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6088-6095. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6088>
- Gaut, J. P., & Heinecke, J. W. (2001). Mechanisms for Oxidizing Low-Density Lipoprotein : Insights from Patterns of Oxidation Products in the Artery Wall and from Mouse Models of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 11(3), 103-112. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00101-3)
- Gibson, C. M., Kastelein, J. J. P., Phillips, A. T., Aylward, P. E., Yee, M. K., Tendera, M., Nicholls, S. J., Pocock, S., Goodman, S. G., Alexander, J. H., Lincoff, A. M., Bode, C., Duffy, D., Heise, M., Berman, G., Mears, S. J., Tricoci, P., Deckelbaum, L. I., Steg, P. G., ... Mehran, R. (2021). Rationale and design of ApoA-I Event Reducing in Ischemic Syndromes II (AEGIS-II) : A phase 3, multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study to investigate the efficacy and safety of CSL112 in subjects after acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, 231, 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2020.10.052>
- Gille, A., Easton, R., D'Andrea, D., Wright, S. D., & Shear, C. L. (2014). CSL112 Enhances Biomarkers of Reverse Cholesterol Transport After Single and Multiple Infusions in Healthy Subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9), 2106-2114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303720>
- Gillotte, K. L., Zaiou, M., Lund-Katz, S., Anantharamaiah, G. M., Holvoet, P., Dhoest, A., Palgunachari, M. N., Segrest, J. P., Weisgraber, K. H., Rothblat, G. H., & Phillips, M. C. (1999). Apolipoprotein-mediated Plasma Membrane Microsolubilization : ROLE OF LIPID AFFINITY AND MEMBRANE

- PENETRATION IN THE EFFLUX OF CELLULAR CHOLESTEROL AND PHOSPHOLIPID *. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2021-2028. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2021>
- Ginsberg, H. N. (1998). LIPOPROTEIN PHYSIOLOGY. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 27(3), 503-519. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(05\)70023-2](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(05)70023-2)
- Glomset, J. A., Janssen, E. T., Kennedy, R., & Dobbins, J. (1966). Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 7(5), 639-648. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39245-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39245-2)
- Gofman, J. W., Glazier, F., Tamplin, A., Strisower, B., & Lalla, O. D. (1954). Lipoproteins, Coronary Heart Disease, and Atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 34(3), 589-607. <https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.3.589>
- Gogonea, V. (2016). Structural Insights into High Density Lipoprotein : Old Models and New Facts. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00318>
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X., & Gao, H. (2011). Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds : Progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(12), 1879-1890. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1032-6>
- Gopinath, S. C. B., Lakshmipriya, T., Md Arshad, M. K., Uda, M. N. A., & Al-Douri, Y. (2019). Nanoelectronics in Biosensing Applications. In *Nanobiosensors for Biomolecular Targeting* (p. 211-224). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00009-9>
- Gordon, D. J., & Rifkind, B. M. (2010, janvier 14). *High-Density Lipoprotein—The Clinical Implications of Recent Studies* (world) [Review-article]. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM198911093211907](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJM198911093211907); Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJM198911093211907>
- Gordon, E. M., Figueroa, D. M., Barochia, A. V., Yao, X., & Levine, S. J. (2016). High-density Lipoproteins and Apolipoprotein A-I : Potential New Players in the Prevention and Treatment of Lung Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2016.00323>

- Gordon, S. M. (2014). Chapter 12 - Proteomic Diversity in HDL : A Driving Force for Particle Function and Target for Therapeutic Intervention. In T. Komoda (Éd.), *The HDL Handbook (Second Edition)* (p. 293-322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407867-3.00012-3>
- Gordon, S. M., McKenzie, B., Kemeh, G., Sampson, M., Perl, S., Young, N. S., Fessler, M. B., & Remaley, A. T. (2015). Rosuvastatin Alters the Proteome of High Density Lipoproteins : Generation of alpha-1-antitrypsin Enriched Particles with Anti-inflammatory Properties. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 14(12), 3247-3257. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054031>
- Gordon, S. M., & Remaley, A. T. (2017). High density lipoproteins are modulators of protease activity : Implications in inflammation, complement activation, and atherothrombosis. *Atherosclerosis*, 259, 104-113. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.015>
- Gordon, T., Castelli, W. P., Hjortland, M. C., Kannel, W. B., & Dawber, T. R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : The Framingham study. *The American Journal of Medicine*, 62(5), 707-714. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(77\)90874-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(77)90874-9)
- Goswami, B., Tayal, D., Gupta, N., & Mallika, V. (2009). Paraoxonase : A multifaceted biomolecule. *Clinica Chimica Acta*, 410(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.09.025>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli* : “Ultracompetent” Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(6), pdb.prot101196. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot101196>
- Grösch, S., Schiffmann, S., & Geisslinger, G. (2012). Chain length-specific properties of ceramides. *Progress in Lipid Research*, 51(1), 50-62. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.11.001>
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P., & Rollins, B. J. (1998). Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. *Molecular Cell*, 2(2), 275-281. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80139-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80139-2)

Gursky, O., & Atkinson, D. (1996). Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1 : Implications for a lipid-free molten globular state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(7), 2991-2995.

H

Haddad, M., & Sharma, S. (2023). Physiology, Lung. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545177/>

Hafiane, A., & Genest, J. (2015). High density lipoproteins : Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clinical*, 3, 175-188.
<https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.01.005>

Han, J.-M., Jeong, T.-S., Lee, W. S., Choi, I., & Cho, K.-H. (2005). Structural and functional properties of V156K and A158E mutants of apolipoprotein A-I in the lipid-free and lipid-bound states. *Journal of Lipid Research*, 46(3), 589-596. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400468-JLR200>

Hayek, H., Kosmider, B., & Bahmed, K. (2021). The role of miRNAs in alveolar epithelial cells in emphysema. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 143, 112216.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112216>

Henderson, C. M., Vaisar, T., & Hoofnagle, A. N. (2016). Isolating and Quantifying Plasma HDL Proteins by Sequential Density Gradient Ultracentrifugation and Targeted Proteomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1410, 105-120. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3524-6_7

Hernández-Jiménez, T., Ferro-Flores, G., Morales-Ávila, E., Isaac-Olivé, K., Ocampo-García, B., Aranda-Lara, L., Santos-Cuevas, C., Luna-Gutiérrez, M., De Nardo, L., Rosato, A., & Meléndez-Alafort, L. (2022). 225Ac-rHDL Nanoparticles : A Potential Agent for Targeted Alpha-Particle Therapy of Tumors Overexpressing SR-BI Proteins. *Molecules*, 27(7), 2156.
<https://doi.org/10.3390/molecules27072156>

- Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., & Lewington, S. (2016). Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circulation Research*, 118(4), 535-546. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>
- Hirayama, S., & Miida, T. (2012). Small dense LDL : An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 215-224. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.010>
- Huang, J., Wang, D., Huang, L.-H., & Huang, H. (2020). Roles of Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Disease : A New Paradigm for Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms21030739>
- Huang, R., Silva, R. A. G. D., Jerome, W. G., Kontush, A., Chapman, M. J., Curtiss, L. K., Hodges, T. J., & Davidson, W. S. (2011). Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2028>
- Huang, Y., DiDonato, J. A., Levison, B. S., Schmitt, D., Li, L., Wu, Y., Buffa, J., Kim, T., Gerstenecker, G. S., Gu, X., Kadiyala, C. S., Wang, Z., Culley, M. K., Hazen, J. E., DiDonato, A. J., Fu, X., Berisha, S. Z., Peng, D., Nguyen, T. T., ... Hazen, S. L. (2014). An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nature Medicine*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nm.3459>
- Huang, Y., & Mahley, R. W. (2014). Apolipoprotein E : Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. *Neurobiology of Disease*, 72, 3-12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.025>
- Huuskonen, J., Olkkonen, V. M., Jauhiainen, M., & Ehnholm, C. (2001). The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*, 155(2), 269-281. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(01\)00447-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(01)00447-6)



- Ibanez, B., Giannarelli, C., Cimmino, G., Santos-Gallego, C. G., Alique, M., Pinero, A., Vilahur, G., Fuster, V., Badimon, L., & Badimon, J. J. (2012). Recombinant HDLMilano exerts greater anti-

- inflammatory and plaque stabilizing properties than HDL wild-type. *Atherosclerosis*, 220(1), 72-77. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.10.006>
- Iessi, E., Marconi, M., Manganelli, V., Sorice, M., Malorni, W., Garofalo, T., & Matarrese, P. (2020). Chapter Five—On the role of sphingolipids in cell survival and death. In J. K. E. Spetz & L. Galluzzi (Éds.), *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 351, p. 149-195). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.02.004>
- Ikon, N., Shearer, J., Liu, J., Tran, J. J., Feng, S., Kamei, A., Beckstead, J. A., Kiss, R. S., Weers, P. M., Ren, G., & Ryan, R. O. (2017). A facile method for isolation of recombinant human apolipoprotein A-I from *E. coli*. *Protein Expression and Purification*, 134, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.015>
- Inagaki, S., & Ghirlando, R. (2017). Nanodisc characterization by analytical ultracentrifugation. *Nanotechnology Reviews*, 6(1), 3-14. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0082>
- Iqbal, J., Walsh, M. T., Hammad, S. M., & Hussain, M. M. (2017). Sphingolipids and Lipoproteins in Health and Metabolic Disorders. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(7), 506-518. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.005>
- Isacchi, A., Sarmientos, P., Lorenzetti, R., & Soria, M. (1989). Mature apolipoprotein AI and its precursor proApoAI : Influence of the sequence at the 5' end of the gene on the efficiency of expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 81(1), 129-137. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90343-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90343-0)

J

- Jacobs, R. L., Devlin, C., Tabas, I., & Vance, D. E. (2004). Targeted Deletion of Hepatic CTP:phosphocholine Cytidylyltransferase α in Mice Decreases Plasma High Density and Very Low Density Lipoproteins *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), 47402-47410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404027200>
- Jahagirdar, R., Zhang, H., Azhar, S., Tobin, J., Attwell, S., Yu, R., Wu, J., McLure, K. G., Hansen, H. C., Wagner, G. S., Young, P. R., Srivastava, R. A. K., Wong, N. C. W., & Johansson, J. (2014). A novel BET bromodomain inhibitor, RVX-208, shows reduction of atherosclerosis in hyperlipidemic

- ApoE deficient mice. *Atherosclerosis*, 236(1), 91-100.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.008>
- Jahangiri, A. (2010). HDL and the acute phase response. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 17(2), 156-160. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328337278b>
- Jayaraman, S., Haupt, C., & Gursky, O. (2015). Thermal transitions in serum amyloid A in solution and on the lipid : Implications for structure and stability of acute-phase HDL[S]. *Journal of Lipid Research*, 56(8), 1531-1542. <https://doi.org/10.1194/jlr.M059162>
- Jean Dallongeville. (2006). Le métabolisme des lipoprotéines. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 41(1), 55-60. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(06\)70608-3](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(06)70608-3)
- Jebari-Benslaiman, S., Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Galicia-Garcia, U., Larrea-Sebal, A., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Cholesterol Efflux Efficiency of Reconstituted HDL Is Affected by Nanoparticle Lipid Composition. *Biomedicines*, 8(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8100373>
- Jian, B., de la Llera-Moya, M., Royer, L., Rothblat, G., Francone, O., & Swaney, J. B. (1997). Modification of the cholesterol efflux properties of human serum by enrichment with phospholipid. *Journal of Lipid Research*, 38(4), 734-744. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37240-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37240-0)
- Johns, D. G., LeVoci, L., Krsmanovic, M., Lu, M., Hartmann, G., Xu, S., Wang, S.-P., Chen, Y., Bateman, T., & Blaustein, R. O. (2019). Characterization of Anacetrapib Distribution into the Lipid Droplet of Adipose Tissue in Mice and Human Cultured Adipocytes. *Drug Metabolism and Disposition*, 47(3), 227-233. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.084525>
- Jomard, A., & Osto, E. (2020). High Density Lipoproteins : Metabolism, Function, and Therapeutic Potential. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2020.00039>
- Jonas, A., Sweeny, S. A., & Herbert, P. N. (1984). Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin : Cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6369-6375. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)82151-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82151-6)

K

- Kadowaki, H., Patton, G., & Robins, S. (1993). Effect of phosphatidylcholine molecular species on the uptake of HDL triglycerides and cholesteryl esters by the liver. *Journal of Lipid Research*, 34(2), 180-189. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40745-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40745-X)
- Kajani, S., Curley, S., & McGillicuddy, F. C. (2018). Unravelling HDL—Looking beyond the Cholesterol Surface to the Quality Within. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms19071971>
- Kanno, K., Wu, M. K., Scapa, E. F., Roderick, S. L., & Cohen, D. E. (2007). Structure and Function of Phosphatidylcholine Transfer Protein (PC-TP)/StarD2. *Biochimica et biophysica acta*, 1771(6), 654-662. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.003>
- Karathanasis, S. K., Freeman, L. A., Gordon, S. M., & Remaley, A. T. (2017). The Changing Face of HDL and the Best Way to Measure It. *Clinical Chemistry*, 63(1), 196-210. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.257725>
- Karavia, E. A., Papachristou, D. J., Liopeta, K., Triantaphyllidou, I.-E., Dimitrakopoulos, O., & Kypreos, K. E. (2012). Apolipoprotein A-I Modulates Processes Associated with Diet-Induced Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Molecular Medicine*, 18(6), 901-912. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00113>
- Kasina, V., Wahane, A., Liu, C.-H., Yang, L., Nieh, M.-P., Slack, F. J., & Bahal, R. (2023). Next-generation poly-L-histidine formulations for miRNA mimic delivery. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, 29, 271-283. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.03.015>
- Khalid, K., Tan, X., Mohd Zaid, H. F., Tao, Y., Lye Chew, C., Chu, D.-T., Lam, M. K., Ho, Y.-C., Lim, J. W., & Chin Wei, L. (2020). Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial : A review. *Bioengineered*, 11(1), 328-355. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1736240>
- Khan, M., Lalwani, N. D., Drake, S. L., Crott, J. G., & Dasseux, J.-L. (2003). Single-dose intravenous infusion of ETC-642, a 22-Mer ApoA-I analogue and phospholipids complex, elevates HDL-C in atherosclerosis patients. *Circulation*, 108, 563-564.

- Khan, Y. S., & Lynch, D. T. (2022). Histology, Lung. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534789/>
- Kidambi, S., & Patel, S. B. (2008). Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters : ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica*, 38(7-8), 1119-1139.
<https://doi.org/10.1080/00498250802007930>
- Kim, C., Lee, J., Park, S.-W., Kim, K., Lee, M. won, Paik, S., Jang, A. soo, Kim, D. J., Uh, S., Kim, Y., & Park, C. (2016). Attenuation of Cigarette Smoke–Induced Emphysema in Mice by Apolipoprotein A-1 Overexpression. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(1), 91-102.
<https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0305OC>
- Kim, Y., Fay, F., Cormode, D. P., Sanchez-Gaytan, B. L., Tang, J., Hennessy, E. J., Ma, M., Moore, K., Farokhzad, O. C., Fisher, E. A., Mulder, W. J. M., Langer, R., & Fayad, Z. A. (2013). Single Step Reconstitution of Multifunctional High-Density Lipoprotein-Derived Nanomaterials Using Microfluidics. *ACS Nano*, 7(11), 9975-9983. <https://doi.org/10.1021/nn4039063>
- Kim, Y., Lee Chung, B., Ma, M., Mulder, W. J. M., Fayad, Z. A., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2012). Mass Production and Size Control of Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles through Controlled Microvortices. *Nano Letters*, 12(7), 3587-3591. <https://doi.org/10.1021/nl301253v>
- Kingwell, B. A., Chapman, M. J., Kontush, A., & Miller, N. E. (2014). HDL-targeted therapies : Progress, failures and future. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(6), 445-464.
<https://doi.org/10.1038/nrd4279>
- Klon, A. E., Jones, M. K., Segrest, J. P., & Harvey, S. C. (2000). Molecular Belt Models for the Apolipoprotein A-I Paris and Milano Mutations. *Biophysical Journal*, 79(3), 1679-1685.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76417-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76417-4)
- Kolleck, I., Schlame, M., Fechner, H., Looman, A. C., Wissel, H., & Rüstow, B. (1999). HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7-8), 882-890. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00139-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00139-2)

- Kolleck, I., Sinha, P., & Rüstow, B. (2002). Vitamin E as an Antioxidant of the Lung : Mechanisms of Vitamin E Delivery to Alveolar Type II Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166(supplement_1), S62-S66. <https://doi.org/10.1164/rccm.2206019>
- Kontush, A., Chantepie, S., & Chapman, M. J. (2003). Small, Dense HDL Particles Exert Potent Protection of Atherogenic LDL Against Oxidative Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(10), 1881-1888. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000091338.93223.E8>
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2011). *High-Density Lipoproteins : Structure, Metabolism, Function and Therapeutics*. John Wiley & Sons.
- Kontush, A., Faria, E. C. de, Chantepie, S., & Chapman, M. J. (2005). A normotriglyceridemic, low HDL-cholesterol phenotype is characterised by elevated oxidative stress and HDL particles with attenuated antioxidative activity. *Atherosclerosis*, 182(2), 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.001>
- Kontush, A., Lhomme, M., & Chapman, M. J. (2013). Unraveling the complexities of the HDL lipidome1. *Journal of Lipid Research*, 54(11), 2950-2963. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036095>
- Kontush, A., Lindahl, M., Lhomme, M., Calabresi, L., Chapman, M. J., & Davidson, W. S. (2015). Structure of HDL : Particle Subclasses and Molecular Components. In A. von Eckardstein & D. Kardassis (Éds.), *High Density Lipoproteins : From Biological Understanding to Clinical Exploitation* (p. 3-51). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_1
- Kontush, A., Therond, P., Zerrad, A., Couturier, M., Nègre-Salvayre, A., de Souza, J. A., Chantepie, S., & Chapman, M. J. (2007). Preferential Sphingosine-1-Phosphate Enrichment and Sphingomyelin Depletion Are Key Features of Small Dense HDL3 Particles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), 1843-1849. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.145672>
- Kornmueller, Vidakovic, & Prassl. (2019). Artificial High Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Research. *Molecules*, 24(15), 2829. <https://doi.org/10.3390/molecules24152829>

- Kosman, J., & Jonas, A. (2001). Deletion of Specific Glycan Chains Affects Differentially the Stability, Local Structures, and Activity of Lecithin-cholesterol Acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37230-37236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104326200>
- Krause, B. R., & Remaley, A. T. (2013). Reconstituted HDL for the acute treatment of acute coronary syndrome. *Current Opinion in Lipidology*, 24(6), 480-486. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000020>
- Krishna, R., Gheyas, F., Liu, Y., Hagen, D., Walker, B., Chawla, A., Cote, J., Blaustein, R., & Gutstein, D. (2017). Chronic Administration of Anacetrapib Is Associated With Accumulation in Adipose and Slow Elimination. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102(5), 832-840. <https://doi.org/10.1002/cpt.700>
- Książek, M., Chacińska, M., Chabowski, A., & Baranowski, M. (2015). Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of Lipid Research*, 56(7), 1271-1281. <https://doi.org/10.1194/jlr.R059543>
- Kuai, R., Li, D., Chen, Y. E., Moon, J. J., & Schwendeman, A. (2016). High-Density Lipoproteins : Nature's Multifunctional Nanoparticles. *ACS Nano*, 10(3), 3015-3041. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07522>
- Kulkarni, K. R., Marcovina, S. M., Krauss, R. M., Garber, D. W., Glasscock, A. M., & Segrest, J. P. (1997). Quantification of HDL2 and HDL3 cholesterol by the Vertical Auto Profile-II (VAP-II) methodology. *Journal of Lipid Research*, 38(11), 2353-2364. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34949-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34949-X)

L

- Lagace, T. A., & Ridgway, N. D. (2013). The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(11), 2499-2510. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.018>

- Lagerstedt, J. O., Cavigliolo, G., Budamagunta, M. S., Pagani, I., Voss, J. C., & Oda, M. N. (2011). Structure of Apolipoprotein A-I N Terminus on Nascent High Density Lipoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 2966-2975. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163097>
- Law, S.-H., Chan, M.-L., Marathe, G. K., Parveen, F., Chen, C.-H., & Ke, L.-Y. (2019). An Updated Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1149. <https://doi.org/10.3390/ijms20051149>
- Lee, C.-K., Liao, C.-W., Meng, S.-W., Wu, W.-K., Chiang, J.-Y., & Wu, M.-S. (2021). Lipids and Lipoproteins in Health and Disease: Focus on Targeting Atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(8), 985. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080985>
- Lee, E. hee, Lee, E., Kim, H. jeong, Jang, A. soo, Koh, E. suk, Uh, S., Kim, Y. hoon, Park, S., & Park, C. (2013). Overexpression of Apolipoprotein A1 in the Lung Abrogates Fibrosis in Experimental Silicosis. *PLoS ONE*, 8(2), e55827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055827>
- Lee, I.-T., & Yang, C.-M. (2013). Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2013, e791231. <https://doi.org/10.1155/2013/791231>
- Lent-Schochet, D., & Jialal, I. (2022). Biochemistry, Lipoprotein Metabolism. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553193/>
- Lerch, P. G., Fortsch, V., Hodler, G., & Bolli, R. (1996). Production and Characterization of a Reconstituted High Density Lipoprotein for Therapeutic Applications. *Vox Sanguinis*, 71(3), 155-164. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1996.7130155.x>
- Lerch, P., Spycher, M., & Doran, J. (1998). Reconstituted High Density Lipoprotein (rHDL) Modulates Platelet Activity In Vitro and Ex Vivo. *Thrombosis and Haemostasis*, 80(08), 316-320. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615194>
- Levine, D. M., Parker, T. S., Donnelly, T. M., Walsh, A., & Rubin, A. L. (1993). In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 12040-12044. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.12040>

- Lewis, B. (1973). Classification of lipoproteins and lipoprotein disorders. *Journal of Clinical Pathology. Supplement (Ass. Clin. Path.)*, 5, 26-31.
- Lhomme, M. C., Camont, L., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2012). Lipidomics in Lipoprotein Biology. In K. Ekroos (Éd.), *Lipidomics* (1^{re} éd., p. 197-217). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9783527655946.ch10>
- Li, W. H., Tanimura, M., Luo, C. C., Datta, S., & Chan, L. (1988). The apolipoprotein multigene family : Biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *Journal of Lipid Research*, 29(3), 245-271. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38532-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38532-1)
- Lightle, S., Tosheva, R., Lee, A., Queen-Baker, J., Boyanovsky, B., Shedlofsky, S., & Nikolova-Karakashian, M. (2003). Elevation of ceramide in serum lipoproteins during acute phase response in humans and mice : Role of serine–palmitoyl transferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419(2), 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.031>
- Lincoff, A. M., Nicholls, S. J., Riesmeyer, J. S., Barter, P. J., Brewer, H. B., Fox, K. A. A., Gibson, C. M., Granger, C., Menon, V., Montalescot, G., Rader, D., Tall, A. R., McElean, E., Wolski, K., Ruotolo, G., Vangerow, B., Weerakkody, G., Goodman, S. G., Conde, D., ... Nissen, S. E. (2017). Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 376(20), 1933-1942. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609581>
- Linton, M. F., Yancey, P. G., Davies, S. S., Jerome, W. G., Linton, E. F., Song, W. L., Doran, A. C., & Vickers, K. C. (2019). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343489/>
- Liu, D. (2020). High-Density Lipoprotein : From Biological Functions to Clinical Perspectives. In *Apolipoproteins, Triglycerides and Cholesterol*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.91136>
- Liu, Y., & Tang, C. (2012). Regulation of ABCA1 Functions by Signaling Pathways. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(3), 522-529. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.08.015>

- Luc, G. (2007). Métabolisme des lipoprotéines de haute densité – Metabolism of high-density lipoproteins. *Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition*.
- Lund-Katz, S., Liu, L., Thuahnai, S., & Phillips, M. (2003). High density lipoprotein structure. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 8, d1044-54. <https://doi.org/10.2741/1077>
- Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (2010). High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport. *Sub-cellular biochemistry*, 51, 183-227. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_7
- Luo, G., Zhang, X., Nilsson-Ehle, P., & Xu, N. (2004). Apolipoprotein M. *Lipids in Health and Disease*, 3, 21. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-21>
- Lüscher, T. F., Landmesser, U., von Eckardstein, A., & Fogelman, A. M. (2014). High-Density Lipoprotein. *Circulation Research*, 114(1), 171-182. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300935>

M

- Ma, X., Song, Q., & Gao, X. (2018). Reconstituted high-density lipoproteins : Novel biomimetic nanocarriers for drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(1), 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.11.006>
- Mackness, B., Hine, D., Liu, Y., Mastorikou, M., & Mackness, M. (2004). Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(3), 680-683. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.056>
- Mahley, R., Innerarity, T., Rall, S., & Weisgraber, K. (1985). Plasma lipoproteins : Apolipoprotein structure and function. *Journal of lipid research*, 25, 1277-1294. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34443-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34443-6)
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E : Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*, 240(4852), 622-630. <https://doi.org/10.1126/science.3283935>
- Mahley, R. W. (2016). Apolipoprotein E : From cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 94, 739-746. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1427-y>

- Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2009). Apolipoprotein E : Structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *Journal of Lipid Research*, 50, S183-S188.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R800069-JLR200>
- Mani, P., & Rohatgi, A. (2015). Niacin Therapy, HDL Cholesterol, and Cardiovascular Disease : Is the HDL Hypothesis Defunct? *Current atherosclerosis reports*, 17(8), 521.
<https://doi.org/10.1007/s11883-015-0521-x>
- Marcon, E., Ni, Z., Pu, S., Turinsky, A. L., Trimble, S. S., Olsen, J. B., Silverman-Gavrila, R., Silverman-Gavrila, L., Phanse, S., Guo, H., Zhong, G., Guo, X., Young, P., Bailey, S., Roudeva, D., Zhao, D., Hewel, J., Li, J., Gräslund, S., ... Greenblatt, J. (2014). Human-Chromatin-Related Protein Interactions Identify a Demethylase Complex Required for Chromosome Segregation. *Cell Reports*, 8(1), 297-310. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.050>
- Márquez, A. B., Nazir, S., & van der Vorst, E. P. C. (2020). High-Density Lipoprotein Modifications : A Pathological Consequence or Cause of Disease Progression? *Biomedicines*, 8(12), 549.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines8120549>
- Martinez, L. O., Jacquet, S., Esteve, J.-P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J. E., Tercé, F., Collet, X., Perret, B., & Barbaras, R. (2003). Ectopic β -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(6918), Article 6918. <https://doi.org/10.1038/nature01250>
- Mathew, J., Sankar, P., & Varacallo, M. (2022). Physiology, Blood Plasma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531504/>
- Matsunaga, A. (2014). Chapter 2—Apolipoprotein A-I Mutations and Clinical Evaluation. In T. Komoda (Éd.), *The HDL Handbook (Second Edition)* (p. 9-35). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407867-3.00002-0>
- Matz, C. E., & Jonas, A. (1982). Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *Journal of Biological Chemistry*, 257(8), 4535-4540. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34756-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34756-2)

- Mayerl, C., Lukasser, M., Sedivy, R., Niederegger, H., Seiler, R., & Wick, G. (2006). Atherosclerosis research from past to present—On the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 449(1), 96-103. <https://doi.org/10.1007/s00428-006-0176-7>
- McIntyre, N. (1988). Familial LCAT deficiency and fish-eye disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 11(S1), 45-56. <https://doi.org/10.1007/BF01800570>
- Meeusen, J. W., Donato, L. J., Bryant, S. C., Baudhuin, L. M., Berger, P. B., & Jaffe, A. S. (2018). Plasma Ceramides. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1933-1939. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311199>
- Mei, X., & Atkinson, D. (2015). Lipid-free Apolipoprotein A-I Structure : Insights into HDL Formation and Atherosclerosis Development. *Archives of Medical Research*, 46(5), 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.05.012>
- Melchior, J. T., Street, S. E., Vaisar, T., Hart, R., Jerome, J., Kuklenyik, Z., Clouet-Foraison, N., Thornock, C., Bedi, S., Shah, A. S., Segrest, J. P., Heinecke, J. W., & Davidson, W. S. (2021). Apolipoprotein A-I modulates HDL particle size in the absence of apolipoprotein A-II. *Journal of Lipid Research*, 62, 100099. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100099>
- Michell, D. L., & Vickers, K. C. (2016). Lipoprotein carriers of microRNAs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(12, Part B), 2069-2074. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.01.011>
- Miles, J., Khan, M., Painchaud, C., Lalwani, N., Drake, S., & Dasseux, J.-L. (2004). *Single-dose tolerability, pharmacokinetics, and cholesterol mobilization in HDL-C fraction following intravenous administration of ETC-642, a 22-mer ApoA-I analogue and phospholipids complex, in atherosclerosis patients* (p. E19).
- Miller, G. J., & Miller, N. E. (1975). PLASMA-HIGH-DENSITY-LIPOPROTEIN CONCENTRATION AND DEVELOPMENT OF ISCHÆMIC HEART-DISEASE. *The Lancet*, 305(7897), 16-19. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)92376-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)92376-4)

- Miller, N. E. (1990). HDL metabolism and its role in lipid transport. *European Heart Journal*, 11(suppl_H), 1-3. https://doi.org/10.1093/eurheartj/11.suppl_H.1
- Miller, N. E., Thelle, D. S., Førde, O. H., & Mjøs, O. D. (1977). THE TROMSØHEART-STUDY : HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN AND CORONARY HEART-DISEASE: A PROSPECTIVE CASE-CONTROL STUDY. *The Lancet*, 309(8019), 965-968. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)92274-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92274-7)
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J. H., & Shaul, P. W. (2006). Endothelial and Antithrombotic Actions of HDL. *Circulation Research*, 98(11), 1352-1364. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000225982.01988.93>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Moldoveanu, B., Otmishi, P., Jani, P., Walker, J., Sarmiento, X., Guardiola, J., Saad, M., & Yu, J. (2008). Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of inflammation research*, 2, 1-11.
- Moldthan, H. L., Hirko, A. C., Thinschmidt, J. S., Grant, M., Li, Z., Peris, J., Lu, Y., Elshikha, A., King, M. A., Hughes, J. A., & Song, S. (2014). Alpha 1-Antitrypsin Therapy Mitigated Ischemic Stroke Damage in Rats. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 23(5), e355-e363. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.12.029>
- Moreno, J.-A., Ortega-Gomez, A., Rubio-Navarro, A., Louedec, L., Ho-Tin-Noé, B., Caligiuri, G., Nicoletti, A., Levoye, A., Plantier, L., & Meilhac, O. (2014). High-Density Lipoproteins Potentiate α 1-Antitrypsin Therapy in Elastase-Induced Pulmonary Emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 51(4), 536-549. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0103OC>
- Muffat, J., & Walker, D. W. (2010). Apolipoprotein D. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(2), 269-273.

N

- Nakano, T., Inoue, I., Katayama, S., Seo, M., Takahashi, S., Hokari, S., Shinozaki, R., Hatayama, K., & Komoda, T. (2009). Lysophosphatidylcholine for Efficient Intestinal Lipid Absorption And Lipoprotein Secretion in Caco-2 Cells. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(2), 227-234. <https://doi.org/10.3164/jcbn.09-25>
- Nakatani, K., Takeshita, S., Tsujimoto, H., Kawamura, Y., & Sekine, I. (2001). Inhibitory effect of serine protease inhibitors on neutrophil-mediated endothelial cell injury. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(2), 241-247. <https://doi.org/10.1189/jlb.69.2.241>
- Nanjee, M. N., Doran, J. E., Lerch, P. G., & Miller, N. E. (1999). Acute Effects of Intravenous Infusion of ApoA1/Phosphatidylcholine Discs on Plasma Lipoproteins in Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(4), 979-989. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.4.979>
- Narasimhan Janakiraman, V., Noubhani, A., Venkataraman, K., Vijayalakshmi, M., & Santarelli, X. (2016). High yield of recombinant human Apolipoprotein A-I expressed in *Pichia pastoris* by using mixed-mode chromatography. *Biotechnology Journal*, 11(1), 117-126. <https://doi.org/10.1002/biot.201500245>
- Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Lenten, B. J. V., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J., & Fogelman, A. M. (2004). Thematic review series : The Pathogenesis of Atherosclerosis The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research*, 45(6), 993-1007. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400001-JLR200>
- Nicholls, S. J., Andrews, J., Kastelein, J. J. P., Merkely, B., Nissen, S. E., Ray, K. K., Schwartz, G. G., Worthley, S. G., Keyserling, C., Dasseux, J.-L., Griffith, L., Kim, S. W., Janssan, A., Di Giovanni, G., Pisaniello, A. D., Scherer, D. J., Psaltis, P. J., & Butters, J. (2018). Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- β High-Density Lipoprotein Mimetic, on Coronary Atherosclerosis in Patients Following Acute Coronary Syndromes in the CER-001 Atherosclerosis Regression Acute

- Coronary Syndrome Trial : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*, 3(9), 815.
<https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.2121>
- Nicholls, S. J., Brewer, H. B., Kastelein, J. J. P., Krueger, K. A., Wang, M.-D., Shao, M., Hu, B., McErlan, E., & Nissen, S. E. (2011). Effects of the CETP Inhibitor Evacetrapib Administered as Monotherapy or in Combination With Statins on HDL and LDL Cholesterol : A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 306(19), 2099-2109. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.1649>
- Nicholls, S. J., Puri, R., Ballantyne, C. M., Jukema, J. W., Kastelein, J. J. P., Koenig, W., Wright, R. S., Kallend, D., Wijngaard, P., Borgman, M., Wolski, K., & Nissen, S. E. (2018). Effect of Infusion of High-Density Lipoprotein Mimetic Containing Recombinant Apolipoprotein A-I Milano on Coronary Disease in Patients With an Acute Coronary Syndrome in the MILANO-PILOT Trial : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiology*, 3(9), 806.
<https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.2112>
- Nicholls, S. J., Tuzcu, E. M., Brennan, D. M., Tardif, J.-C., & Nissen, S. E. (2008). Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition, High-Density Lipoprotein Raising, and Progression of Coronary Atherosclerosis. *Circulation*, 118(24), 2506-2514.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790733>
- Nichols, A. V., Krauss, R. M., & Musliner, T. A. (1986). [24] Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 128, p. 417-431). Academic Press.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28084-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28084-2)
- Nikolic, D., Rizzo, M., Mikhailidis, D. P., Wong, N. C., & Banach, M. (2015). An evaluation of RVX-208 for the treatment of atherosclerosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(10), 1389-1398. <https://doi.org/10.1517/13543784.2015.1083010>
- Nilsson, Å., & Duan, R.-D. (2006). Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. *Journal of Lipid Research*, 47(1), 154-171. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500357-JLR200>

Nkadi, P. O., Merritt, T. A., & Pillers, D.-A. M. (2009). An overview of pulmonary surfactant in the neonate : Genetics, metabolism, and the role of surfactant in health and disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 97(2), 95-101. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.01.015>

O

Olson, R. E. (1998). Discovery of the Lipoproteins, Their Role in Fat Transport and Their Significance as Risk Factors. *The Journal of Nutrition*, 128(2), 439S-443S. <https://doi.org/10.1093/jn/128.2.439S>

Oncley, J. L., Gurd, F. R. N., & Melin, M. (1950). Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XXV. Composition and Properties of Human Serum β -Lipoprotein_{1,2,3}. *Journal of the American Chemical Society*, 72(1), 458-464. <https://doi.org/10.1021/ja01157a121>

Ono, K. (2016). Functions of microRNA-33a/b and microRNA therapeutics. *Journal of Cardiology*, 67(1), 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.10.017>

Ortiz-Muñoz, G., Houard, X., Martín-Ventura, J.-L., Ishida, B. Y., Loyau, S., Rossignol, P., Moreno, J.-A., Kane, J. P., Chalkley, R. J., Burlingame, A. L., Michel, J.-B., & Meilhac, O. (2009). HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *The FASEB Journal*, 23(9), 3129-3139. <https://doi.org/10.1096/fj.08-127928>

Ossoli, A., Wolska, A., Remaley, A. T., & Gomaschi, M. (2022). High-density lipoproteins : A promising tool against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1867(1), 159068. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159068>

P

Pajkrt, D., Lerch, P. G., Poll, T. van der, Levi, M., Illi, M., Doran, J. E., Arnet, B., Ende, A. van den, Cate, J. W. ten, & Deventer, S. J. H. van. (1997). Differential Effects of Reconstituted High-density

- Lipoprotein on Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Activation during Human Endotoxemia. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(2), 303-307. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1655958>
- Patanapirunhakitt, P., Karlsson, H., Mulder, M., Ljunggren, S., Graham, D., & Freeman, D. (2021). Sphingolipids in HDL – Potential markers for adaptation to pregnancy? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(8), 158955. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.158955>
- Peng, H.-S., & Chiu, D. T. (2015). Soft fluorescent nanomaterials for biological and biomedical imaging. *Chemical Society Reviews*, 44(14), 4699-4722. <https://doi.org/10.1039/C4CS00294F>
- Petrolova, J., Dalla-Riva, J., Mörgelin, M., Lindahl, M., Krupinska, E., Stenkula, K. G., Voss, J. C., & Lagerstedt, J. O. (2014). Secondary Structure Changes in ApoA-I Milano (R173C) Are Not Accompanied by a Decrease in Protein Stability or Solubility. *PLOS ONE*, 9(4), e96150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096150>
- Phillips, M. C. (2013). New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins1 : Thematic Review Series: High Density Lipoprotein Structure, Function, and Metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(8), 2034-2048. <https://doi.org/10.1194/jlr.R034025>
- Pian, M. S., & Dobbs, L. G. (1997). Lipoprotein-stimulated surfactant secretion in alveolar type II cells : Mediation by heterotrimeric G proteins. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 273(3), L634-L639. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.3.L634>
- Pittman, R. C., Glass, C. K., Atkinson, D., & Small, D. M. (1987). Synthetic high density lipoprotein particles. Application to studies of the apoprotein specificity for selective uptake of cholesterol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(6), 2435-2442.
- Provost, P. R., Boucher, E., & Tremblay, Y. (2009). Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *Journal of Endocrinology*, 200(3), 321-330. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0238>

Q

- Qian, H., Zhao, X., Cao, P., Lei, J., Yan, N., & Gong, X. (2017). Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell*, 169(7), 1228-1239.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.020>
- Qiu, C., Zhao, X., Zhou, Q., & Zhang, Z. (2017). High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity is inversely associated with cardiovascular risk : A systematic review and meta-analysis. *Lipids in Health and Disease*, 16(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0604-5>

R

- Rader, D. J., & Tall, A. R. (2012). Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis? *Nature Medicine*, 18(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nm.2937>
- Rahmany, S., & Jialal, I. (2022). Biochemistry, Chylomicron. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545157/>
- Rämet, M. E., Rämet, M., Lu, Q., Nickerson, M., Savolainen, M. J., Malzone, A., & Karas, R. H. (2003). High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), 2288-2297. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00481-9](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00481-9)
- Ramms, B., & Gordts, P. L. S. M. (2018). Apolipoprotein C-III in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 29(3), 171-179. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000502>
- Rassart, E., Bedirian, A., Do Carmo, S., Guinard, O., Sirois, J., Terrisse, L., & Milne, R. (2000). Apolipoprotein D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1), 185-198. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00162-X)
- Raut, S., Mooberry, L., Sabnis, N., Garud, A., Dossou, A. S., & Lacko, A. (2018). Reconstituted HDL : Drug Delivery Platform for Overcoming Biological Barriers to Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1154. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01154>

- Ray, K. K., Nicholls, S. J., Buhr, K. A., Ginsberg, H. N., Johansson, J. O., Kalantar-Zadeh, K., Kulikowski, E., Toth, P. P., Wong, N., Sweeney, M., Schwartz, G. G., & BETonMACE Investigators and Committees. (2020). Effect of Apabetalone Added to Standard Therapy on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Recent Acute Coronary Syndrome and Type 2 Diabetes : A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 323(16), 1565-1573. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3308>
- Reijers, J. A. A., Kallend, D. G., Malone, K. E., Jukema, J. W., Wijngaard, P. L. J., Burggraaf, J., & Moerland, M. (2017). MDCO-216 Does Not Induce Adverse Immunostimulation, in Contrast to Its Predecessor ETC-216. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 31(4), 381-389. <https://doi.org/10.1007/s10557-017-6746-x>
- Rijal, N. (2020, juin 8). *Electron Microscope : Principle, Types, Applications • Microbe Online*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/electron-microscope-principle-types-applications/>
- Rohatgi, A., Westerterp, M., von Eckardstein, A., Remaley, A., & Rye, K.-A. (2021). HDL in the 21st Century : A Multifunctional Roadmap for Future HDL Research. *Circulation*, 143(23), 2293-2309. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.044221>
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Jr, Chapman, M. J., Fazio, S., Hussain, M. M., Kontush, A., Krauss, R. M., Otvos, J. D., Remaley, A. T., & Schaefer, E. J. (2011). HDL Measures, Particle Heterogeneity, Proposed Nomenclature, and Relation to Atherosclerotic Cardiovascular Events. *Clinical Chemistry*, 57(3), 392-410. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.155333>
- Russ, E. M., Eder, H. A., & Barr, D. P. (1951). Protein-lipid relationships in human plasma : I. In normal individuals. *The American Journal of Medicine*, 11(4), 468-479. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(51\)90182-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(51)90182-9)
- Ryan, R. O., Forte, T. M., & Oda, M. N. (2003). Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I. *Protein Expression and Purification*, 27(1), 98-103. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(02\)00568-5](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(02)00568-5)

Rye, K.-A., & Barter, P. J. (2004). Formation and Metabolism of Prebeta-Migrating, Lipid-Poor Apolipoprotein A-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(3), 421-428. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000104029.74961.f5>

Rye, K.-A., Bursill, C. A., Lambert, G., Tabet, F., & Barter, P. J. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *Journal of Lipid Research*, 50, S195-S200. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800034-JLR200>

S

Sacks, F. M. (2002). The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease : Expert group recommendations. *American Journal of Cardiology*, 90(2), 139-143. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(02\)02436-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02436-0)

Sacks, F. M., Pfeffer, M. A., Moye, L. A., Rouleau, J. L., Rutherford, J. D., Cole, T. G., Brown, L., Warnica, J. W., Arnold, J. M. O., Wun, C.-C., Davis, B. R., & Braunwald, E. (1996). The Effect of Pravastatin on Coronary Events after Myocardial Infarction in Patients with Average Cholesterol Levels. *New England Journal of Medicine*, 335(14), 1001-1009. <https://doi.org/10.1056/NEJM199610033351401>

Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Deridder, E., Holvoet, P., Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (2004). α -Helix Formation Is Required for High Affinity Binding of Human Apolipoprotein A-I to Lipids *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20974-20981. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402043200>

Saito, H., Dhanasekaran, P., Nguyen, D., Holvoet, P., Lund-Katz, S., & Phillips, M. C. (2003). Domain Structure and Lipid Interaction in Human Apolipoproteins A-I and E, a General Model. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23227-23232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303365200>

Salazar, J., Olivar, L. C., Ramos, E., Chávez-Castillo, M., Rojas, J., & Bermúdez, V. (2015). Dysfunctional High-Density Lipoprotein : An Innovative Target for Proteomics and Lipidomics. *Cholesterol*, 2015, e296417. <https://doi.org/10.1155/2015/296417>

- Sato, M., Ohkawa, R., Yoshimoto, A., Yano, K., Ichimura, N., Nishimori, M., Okubo, S., Yatomi, Y., & Tozuka, M. (2016). Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Bioscience Reports*, 36(4), e00369. <https://doi.org/10.1042/BSR20160075>
- Schaefer, E. J., Santos, R. D., & Asztalos, B. F. (2010). Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. *Current opinion in lipidology*, 21(4), 289-297. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833c1ef6>
- Schmidt, A., Geigenmüller, S., Völker, W., & Buddecke, E. (2006). The antiatherogenic and antiinflammatory effect of HDL-associated lysosphingolipids operates via Akt—>NF-kappaB signalling pathways in human vascular endothelial cells. *Basic Research in Cardiology*, 101(2), 109-116. <https://doi.org/10.1007/s00395-005-0582-z>
- Schmidt, H. H.-J., Genschel, J., Haas, R., Büttner, C., & Manns, M. P. (1997). Expression and Purification of Recombinant Human Apolipoprotein A-I in Chinese Hamster Ovary Cells. *Protein Expression and Purification*, 10(2), 226-236. <https://doi.org/10.1006/prep.1997.0753>
- Schmidt, K., Noureen, A., Kronenberg, F., & Utermann, G. (2016). Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *Journal of Lipid Research*, 57(8), 1339-1359. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067314>
- Schmitz, G., & Ruebsaamen, K. (2010). Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis*, 208(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.029>
- Schultz, M. L., Fawaz, M. V., Azaria, R. D., Hollon, T. C., Liu, E. A., Kunkel, T. J., Halseth, T. A., Krus, K. L., Ming, R., Morin, E. E., McLoughlin, H. S., Bushart, D. D., Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Orringer, D. A., Schwendeman, A. S., & Lieberman, A. P. (2019). Synthetic high-density lipoprotein nanoparticles for the treatment of Niemann–Pick diseases. *BMC Medicine*, 17(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1423-5>
- Schwartz, G. G., Olsson, A. G., Abt, M., Ballantyne, C. M., Barter, P. J., Brumm, J., Chaitman, B. R., Holme, I. M., Kallend, D., Leiter, L. A., Leitersdorf, E., McMurray, J. J. V., Mundl, H., Nicholls, S.

- J., Shah, P. K., Tardif, J.-C., & Wright, R. S. (2012). Effects of Dalcetrapib in Patients with a Recent Acute Coronary Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 367(22), 2089-2099. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1206797>
- Schwendeman, A., Sviridov, D. O., Yuan, W., Guo, Y., Morin, E. E., Yuan, Y., Stonik, J., Freeman, L., Ossoli, A., Thacker, S., Killion, S., Pryor, M., Chen, Y. E., Turner, S., & Remaley, A. T. (2015). The effect of phospholipid composition of reconstituted HDL on its cholesterol efflux and anti-inflammatory properties. *Journal of Lipid Research*, 56(9), 1727-1737. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060285>
- Segrest, J. P. (1977). Amphipathic helices and plasma lipoproteins : Thermodynamic and geometric considerations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 18(1), 7-22. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(77\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(77)90023-8)
- Segrest, J. P., Jones, M. K., Loof, H. D., Brouillette, C. G., Venkatachalapathi, Y. V., & Anantharamaiah, G. M. (1992). The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins : A review of secondary structure and function. *Journal of Lipid Research*, 33(2), 141-166. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41536-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41536-6)
- Semenkovich, C. F., Goldberg, A. C., & Goldberg, I. J. (2016). Chapter 37—Disorders of Lipid Metabolism. In S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, & H. M. Kronenberg (Éds.), *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)* (p. 1660-1700). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00037-X>
- Shah, A. S., Tan, L., Long, J. L., & Davidson, W. S. (2013). Proteomic diversity of high density lipoproteins : Our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond¹. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2575-2585. <https://doi.org/10.1194/jlr.R035725>
- Shah, P. K., Yano, J., Reyes, O., Chyu, K.-Y., Kaul, S., Bisgaier, C. L., Drake, S., & Cercek, B. (2001). High-Dose Recombinant Apolipoprotein A-IMilano Mobilizes Tissue Cholesterol and Rapidly Reduces Plaque Lipid and Macrophage Content in Apolipoprotein E–Deficient Mice. *Circulation*, 103(25), 3047-3050. <https://doi.org/10.1161/hc2501.092494>

- Shahzad, M. M., Mangala, L. S., Han, H. D., Lu, C., Bottsford-Miller, J., Nishimura, M., Mora, E. M., Lee, J.-W., Stone, R. L., Pecot, C. V., Thanapparasr, D., Roh, J.-W., Gaur, P., Nair, M. P., Park, Y.-Y., Sabnis, N., Deavers, M. T., Lee, J.-S., Ellis, L. M., ... Sood, A. K. (2011). Targeted Delivery of Small Interfering RNA Using Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 13(4), 309-319.
- Shao, B., & Heinecke, J. W. (2018). Quantifying HDL proteins by mass spectrometry : How many proteins are there and what are their functions? *Expert review of proteomics*, 15(1), 31-40.
<https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1402680>
- Shao, B., Mathew, A. V., Thornock, C., Pennathur, S., Kretzler, M., Gipson, D., Bitzer, M., Gadegbeku, C., Bellovich, K., Bhat, Z., Massengill, S., & Perumal, K. (2021). Altered HDL proteome predicts incident CVD in chronic kidney disease patients. *Journal of Lipid Research*, 62, 100135.
<https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100135>
- Shepherd, J., Cobbe, S. M., Ford, I., Isles, C. G., Lorimer, A. R., Macfarlane, P. W., McKillop, J. H., & Packard, C. J. (1995). Prevention of Coronary Heart Disease with Pravastatin in Men with Hypercholesterolemia. *New England Journal of Medicine*, 333(20), 1301-1308.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199511163332001>
- Shih, A. Y., Sligar, S. G., & Schulten, K. (2009). Maturation of high-density lipoproteins. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(39), 863-871. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0173>
- Shindo, A., Tanemura, H., Yata, K., Hamada, K., Shibata, M., Umeda, Y., Asakura, F., Toma, N., Sakaida, H., Fujisawa, T., Taki, W., & Tomimoto, H. (2014). Inflammatory Biomarkers in Atherosclerosis : Pentraxin 3 Can Become a Novel Marker of Plaque Vulnerability. *PLoS ONE*, 9(6), e100045.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100045>
- Shridas, P., Patrick, A. C., & Tannock, L. R. (2021). Role of Serum Amyloid A in Abdominal Aortic Aneurysm and Related Cardiovascular Diseases. *Biomolecules*, 11(12), 1883.
<https://doi.org/10.3390/biom11121883>

- Siemianowicz, K., Gminski, J., Stajszczyk, M., Wojakowski, W., Goss, M., Machalski, M., Telega, A., Brulinski, K., & Magiera-Molendowska, H. (2000). Serum HDL cholesterol concentration in patients with squamous cell and small cell lung cancer. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.3.307>
- Silva, R. A. G. D., Hilliard, G. M., Fang, J., Macha, S., & Davidson, W. S. (2005). A Three-Dimensional Molecular Model of Lipid-Free Apolipoprotein A-I Determined by Cross-Linking/Mass Spectrometry and Sequence Threading. *Biochemistry*, 44(8), 2759-2769. <https://doi.org/10.1021/bi047717+>
- Silva, R. A. G. D., Huang, R., Morris, J., Fang, J., Gracheva, E. O., Ren, G., Kontush, A., Jerome, W. G., Rye, K.-A., & Davidson, W. S. (2008). Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(34), 12176-12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803626105>
- Silva, R. A. G. D., Schneeweis, L. A., Krishnan, S. C., Zhang, X., Axelsen, P. H., & Davidson, W. S. (2007). The Structure of Apolipoprotein A-II in Discoidal High Density Lipoproteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(13), 9713-9721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610380200>
- Singh, S. A., Andraski, A. B., Higashi, H., Lee, L. H., Ramsaroop, A., Sacks, F. M., & Aikawa, M. (2021). Metabolism of PLTP, CETP, and LCAT on multiple HDL sizes using the Orbitrap Fusion Lumos. *JCI Insight*, 6(3), e143526. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.143526>
- Sirtori, C. R., Ruscica, M., Calabresi, L., Chiesa, G., Giovannoni, R., & Badimon, J. J. (2019). HDL therapy today : From atherosclerosis, to stent compatibility to heart failure. *Annals of Medicine*, 51(7-8), 345-359. <https://doi.org/10.1080/07853890.2019.1694695>
- Skipski, V. P., Barclay, M., Barclay, R. K., Fetzer, V. A., Good, J. J., & Archibald, F. M. (1967). Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochemical Journal*, 104(2), 340-352.
- Soran, H., Schofield, J. D., & Durrington, P. N. (2015). Antioxidant properties of HDL. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00222>

- Sorci-Thomas, M. G., Bhat, S., & Thomas, M. J. (2009). Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. *Clinical Lipidology*, 4(1), 113-124. <https://doi.org/10.2217/17584299.4.1.113>
- Sorci-Thomas, M. G., Parks, J. S., Kearns, M. W., Pate, G. N., Zhang, C., & Thomas, M. J. (1996). High level secretion of wild-type and mutant forms of human proapoA-I using baculovirus-mediated Sf-9 cell expression. *Journal of Lipid Research*, 37(3), 673-683. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37608-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37608-2)
- Specht, E., Miyake-Stoner, S., & Mayfield, S. (2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 32(10), 1373-1383. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0326-5>
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J.-C. (1998). Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation*, 98(19), 2088-2093. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.19.2088>
- Stasi, A., Franzin, R., Fiorentino, M., Squicciarro, E., Castellano, G., & Gesualdo, L. (2021). Multifaced Roles of HDL in Sepsis and SARS-CoV-2 Infection : Renal Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms22115980>
- Stoller, J. K., & Aboussouan, L. S. (2012). A Review of α_1 -Antitrypsin Deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(3), 246-259. <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1428CI>
- Stoller, J. K., Hupertz, V., & Aboussouan, L. S. (2023). *Alpha-1 Antitrypsin Deficiency—GeneReviews®—NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1519/>
- Stroock, A. D. (2008). MICROFLUIDICS. In *Optical Biosensors* (p. 659-681). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044453125-4.50019-X>
- Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Trolly, M., Salvayre, R., & Nègre-Salvayre, A. (1997). HDL and ApoA Prevent Cell Death of Endothelial Cells Induced by Oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(10), 2158-2166. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.10.2158>

- Sugano, M., Tsuchida, K., & Makino, N. (2000). High-Density Lipoproteins Protect Endothelial Cells from Tumor Necrosis Factor- α -Induced Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(3), 872-876. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2877>
- Sullivan, D., & Lewis, B. (2011). A classification of lipoprotein disorders: implications for clinical management. *Clinical Lipidology*, 6(3), 327-338. <https://doi.org/10.2217/clp.11.24>
- Sviridov, D. (2009). Maturation of apolipoprotein A-I : Unrecognized health benefit or a forgotten rudiment? *Journal of Lipid Research*, 50(7), 1257-1258. <https://doi.org/10.1194/jlr.E900003-JLR200>

T

- Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., Catherinet, C., Prado-Lourenco, L., Levin, M. G., Thacker, S., Sethupathy, P., Barter, P. J., Remaley, A. T., & Rye, K.-A. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature Communications*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms4292>
- Taleb, S. (2016). Inflammation in atherosclerosis. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 109(12), 708-715. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.04.002>
- Tall, A. R., & Rader, D. J. (2018). The Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circulation research*, 122(1), 106-112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311978>
- Tanaka, S., Begue, F., Veeren, B., Tran-Dinh, A., Robert, T., Tashk, P., Lortat-Jacob, B., Faille, D., De Chaisemartin, L., Zappella, N., Atchade, E., Kramer, L., Montravers, P., & Meilhac, O. (2022). First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation. *Biomedicines*, 10(4), 754. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040754>
- Tang, J., Li, D., Drake, L., Yuan, W., Deschaine, S., Morin, E. E., Ackermann, R., Olsen, K., Smith, D. E., & Schwendeman, A. (2017). Influence of route of administration and lipidation of apolipoprotein A-I peptide on pharmacokinetics and cholesterol mobilization. *Journal of Lipid Research*, 58(1), 124-136. <https://doi.org/10.1194/jlr.M071043>

- Tankeshwar, A. (2018, avril 27). *SEM vs. TEM Electron Microscopy* • *Microbe Online*. Microbe Online.
<https://microbeonline.com/difference-electron-microscopy-between-sem-tem/>
- Tardif, J.-C., Ballantyne, C. M., Barter, P., Dasseux, J.-L., Fayad, Z. A., Guertin, M.-C., Kastelein, J. J. P., Keyserling, C., Klepp, H., Koenig, W., L'Allier, P. L., Lesperance, J., Luscher, T. F., Paolini, J. F., Tawakol, A., Waters, D. D., for the Can Hdl Infusions Significantly QUICKen Atherosclerosis REGression (CHI-SQUARE) Investigators, Pfeffer, M., Brown, V., ... Weinstein, D. (2014). Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: A randomized trial. *European Heart Journal*, 35(46), 3277-3286. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu171>
- Tardif, J.-C., & Heinonen, T. (2007). Effects of Reconstituted High-density Lipoprotein Infusions on Coronary Atherosclerosis. *US Cardiology Review*, 4(2), 32-34.
<https://doi.org/10.15420/usc.2007.4.2.32>
- Targońska-Stępnia, B., & Majdan, M. (2014). Serum Amyloid A as a Marker of Persistent Inflammation and an Indicator of Cardiovascular and Renal Involvement in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014, e793628. <https://doi.org/10.1155/2014/793628>
- Tarn, M. D., & Pamme, N. (2014). Microfluidics. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (p. B9780124095472054000). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.05351-8>
- Taskinen, M.-R., & Borén, J. (2016). Why Is Apolipoprotein CIII Emerging as a Novel Therapeutic Target to Reduce the Burden of Cardiovascular Disease? *Current Atherosclerosis Reports*, 18(10), 59.
<https://doi.org/10.1007/s11883-016-0614-1>
- Taylor, L. A., Arends, J., Hodina, A. K., Unger, C., & Massing, U. (2007). Plasma lyso-phosphatidylcholine concentration is decreased in cancer patients with weight loss and activated inflammatory status. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-17>

- Teckman, J. H., & Blomenkamp, K. S. (2017). Pathophysiology of Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Liver Disease. In F. Borel & C. Mueller (Éds.), *Alpha-1 Antitrypsin Deficiency : Methods and Protocols* (p. 1-8). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7163-3_1
- Thakkar, H., Vincent, V., Sen, A., Singh, A., & Roy, A. (2021). Changing Perspectives on HDL : From Simple Quantity Measurements to Functional Quality Assessment. *Journal of Lipids*, 2021, e5585521. <https://doi.org/10.1155/2021/5585521>
- The AIM-HIGH Investigators. (2011). Niacin in Patients with Low HDL Cholesterol Levels Receiving Intensive Statin Therapy. *New England Journal of Medicine*, 365(24), 2255-2267. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107579>
- The HPS2-THRIVE Collaborative Group. (2014). Effects of Extended-Release Niacin with Laropiprant in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine*, 371(3), 203-212. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1300955>
- Toikka, J. O., Ahotupa, M., Viikari, J. S. A., Niinikoski, H., Taskinen, M.-R., Irjala, K., Hartiala, J. J., & Raitakari, O. T. (1999). Constantly low HDL-cholesterol concentration relates to endothelial dysfunction and increased in vivo LDL-oxidation in healthy young men. *Atherosclerosis*, 147(1), 133-138. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00186-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00186-0)
- Tölle, A., Kolleck, I., Schlame, M., Wauer, R., Stevens, P. A., & Rüstow, B. (1997). Effect of hyperoxia on the composition of the alveolar surfactant and the turnover of surfactant phospholipids, cholesterol, plasmalogens and vitamin E. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1346(2), 198-204. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00036-2)
- Tölle, M., Pawlak, A., Schuchardt, M., Kawamura, A., Tietge, U. J., Lorkowski, S., Keul, P., Assmann, G., Chun, J., Levkau, B., van der Giet, M., & Nofer, J.-R. (2008). HDL-Associated Lysosphingolipids Inhibit NAD(P)H Oxidase-Dependent Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(8), 1542-1548. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161042>

- Torsney, E., Grisha Pirianov, Charolidi, N., Shoreim, A., Gaze, D., Petrova, S., Laing, K., Meisinger, T., Xiong, W., Baxter, B. T., & Cockerill, G. W. (2012). Elevation of Plasma High-Density Lipoproteins Inhibits Development of Experimental Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(11), 2678-2686. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.00009>
- Tran-Dinh, A., Diallo, D., Delbosc, S., Varela-Perez, L. M., Dang, Q., Lapergue, B., Burillo, E., Michel, J., Levoye, A., Martin-Ventura, J., & Meilhac, O. (2013). HDL and endothelial protection. *British Journal of Pharmacology*, 169(3), 493-511. <https://doi.org/10.1111/bph.12174>
- Trigatti, B. L., Krieger, M., & Rigotti, A. (2003). Influence of the HDL Receptor SR-BI on Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(10), 1732-1738. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000091363.28501.84>
- Tripathy, S., Vinokour, E., McMahon, K. M., Volpert, O. V., & Thaxton, C. S. (2014). High-Density Lipoprotein Nanoparticles Deliver RNAi to Endothelial Cells to Inhibit Angiogenesis. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(11), 1141-1150. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201400036>

U

- Uribe, K. B., Benito-Vicente, A., Martin, C., Blanco-Vaca, F., & Rotllan, N. (2021). (r)HDL in theranostics : How do we apply HDL's biology for precision medicine in atherosclerosis management? *Biomaterials Science*, 9(9), 3185-3208. <https://doi.org/10.1039/D0BM01838D>

V

- Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R. H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X.-Q., Elkon, K., Marcovina, S., Ridker, P., ... Heinecke, J. W. (2007). Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 746-756. <https://doi.org/10.1172/JCI26206>

- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13(4), 423-433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
- Vickers, K. C., & Remaley, A. T. (2012). Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current opinion in lipidology*, 23(2), 91-97. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328350a425>
- Vickers, K. C., & Remaley, A. T. (2014). HDL and cholesterol : Life after the divorce? *Journal of Lipid Research*, 55(1), 4-12. <https://doi.org/10.1194/jlr.R035964>
- Viñals, M., Martínez-González, J., & Badimon, L. (1999). Regulatory Effects of HDL on Smooth Muscle Cell Prostacyclin Release. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(10), 2405-2411. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.10.2405>
- Viranaicken, W., Nativel, B., Krejbich-Trotot, P., Harrabi, W., Bos, S., El Kalamouni, C., Roche, M., Gadea, G., & Desprès, P. (2017). ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. *Biochimie*, 142, 179-182. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.011>
- Vuilleumier, N., Dayer, J.-M., von Eckardstein, A., & Roux-Lombard, P. (2013). Pro- or anti-inflammatory role of apolipoprotein A-1 in high-density lipoproteins? *Swiss Medical Weekly*, 143, w13781. <https://doi.org/10.4414/smw.2013.13781>

W

- Waldie, S., Giudice, R. D., Cárdenas, M., Waldie, S., Giudice, R. D., & Cárdenas, M. (2021). Structure of Lipoproteins and Their Capacity for Lipid Exchange : Relevance for Development of Atherosclerosis and Its Treatment by HDL Therapy. In *Management of Dyslipidemia*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95868>
- Wang, H. H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q.-H. (2017). Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis : Recent Advances in Reverse Cholesterol Transport. *Annals of Hepatology*, 16, S27-S42. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5495>

- White, R., Giordano, S., & Datta, G. (2017). Role of HDL-Associated Proteins and Lipids in the Regulation of Inflammation. In *Advances in Lipoprotein Research*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67141>
- Wiesner, P., Leidl, K., Boettcher, A., Schmitz, G., & Liebisch, G. (2009). Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 50(3), 574-585. <https://doi.org/10.1194/jlr.D800028-JLR200>
- Williams, K. J., & Tabas, I. (1998). The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Current Opinion in Lipidology*, 9(5), 471-474. <https://doi.org/10.1097/00041433-199810000-00012>
- Wilson, P. W., Abbott, R. D., & Castelli, W. P. (1988). High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 8(6), 737-741. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.8.6.737>
- Wolska, A., Dunbar, R. L., Freeman, L. A., Ueda, M., Amar, M. J., Sviridov, D. O., & Remaley, A. T. (2017). Apolipoprotein C-II : New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis*, 267, 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.10.025>
- Wu, Z., Wagner, M. A., Zheng, L., Parks, J. S., Shy, J. M., Smith, J. D., Gogonea, V., & Hazen, S. L. (2007). The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(9), 861-868. <https://doi.org/10.1038/nsmb1284>

X

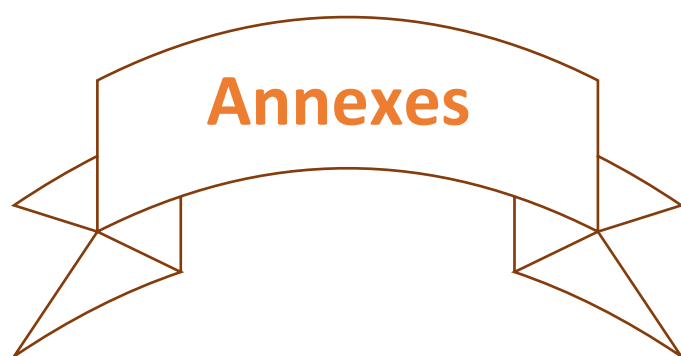
- Xiao, Y., Zhang, B., Hsieh, A., Thavandiran, N., Martin, C., & Radisic, M. (2013). Microfluidic Cell Culture Techniques. In *Microfluidic Cell Culture Systems* (p. 303-321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3459-1.00012-0>

Y

- Yancey, P. G., Bortnick, A. E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (2003). Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), 712-719. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000057572.97137.DD>
- Yang, Z., Hao, D., Che, Y., Zhang, L., & Zhang, S. (2018). Structural Basis and Functional Mechanism of Lipoprotein in Cholesterol Transport. In M. L. Nagpal (Éd.), *Cholesterol—Good, Bad and the Heart*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76015>
- Yetukuri, L., Söderlund, S., Koivuniemi, A., Seppänen-Laakso, T., Niemelä, P. S., Hyvönen, M., Taskinen, M.-R., Vattulainen, I., Jauhiainen, M., & Orešič, M. (2010). Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2341-2351. <https://doi.org/10.1194/jlr.M006494>
- Yiallourous, P. K., Savva, S. C., Kolokotroni, O., Behbod, B., Zeniou, M., Economou, M., Chadjigeorgiou, C., Kourides, Y. A., Tornaritis, M. J., Lamnisis, D., Middleton, N., & Milton, D. K. (2012). Low serum high-density lipoprotein cholesterol in childhood is associated with adolescent asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, 42(3), 423-432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2011.03940.x>
- Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23), 1875-1882. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.038>
- Yu, Z., Jin, J., Wang, Y., & Sun, J. (2017). High density lipoprotein promoting proliferation and migration of type II alveolar epithelial cells during inflammation state. *Lipids in Health and Disease*, 16, 91. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0482-x>
- Yui, Y., Aoyama, T., Morishita, H., Takahashi, M., Takatsu, Y., & Kawai, C. (1988). Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). A novel function of Apo A-I. *The Journal of Clinical Investigation*, 82(3), 803-807. <https://doi.org/10.1172/JCI113682>

Z

- Zafirova-Ivanovska, B., Stojkovikj, J., Dokikj, D., Anastasova, S., Debresliovska, A., Zejnel, S., & Stojkovikj, D. (2016). The Level of Cholesterol in COPD Patients with Severe and Very Severe Stage of the Disease. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 4(2), 277-282. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2016.063>
- Zhang, L., Yan, F., Zhang, S., Lei, D., Charles, M. A., Cavigiolio, G., Oda, M., Krauss, R. M., Weisgraber, K. H., Rye, K.-A., Pownall, H. J., Qiu, X., & Ren, G. (2012). Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nature chemical biology*, 8(4), 342-349. <https://doi.org/10.1038/nchembio.796>
- Zhang, L.-H., Kotite, L., & Havel, R. J. (1996). Identification, Characterization, Cloning, and Expression of Apolipoprotein C-IV, a Novel Sialoglycoprotein of Rabbit Plasma Lipoproteins (*). *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1776-1783. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1776>
- Zhang, Y., Gordon, S. M., Xi, H., Choi, S., Paz, M. A., Sun, R., Yang, W., Saredy, J., Khan, M., Remaley, A. T., Wang, J.-F., Yang, X., & Wang, H. (2019). HDL subclass proteomic analysis and functional implication of protein dynamic change during HDL maturation. *Redox Biology*, 24, 101222. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101222>
- Zhang, Z., Chen, J., Ding, L., Jin, H., Lovell, J. F., Corbin, I. R., Cao, W., Lo, P., Yang, M., Tsao, M., Luo, Q., & Zheng, G. (2010). HDL-Mimicking Peptide–Lipid Nanoparticles with Improved Tumor Targeting. *Small*, 6(3), 430-437. <https://doi.org/10.1002/sml.200901515>
- Zhou, L., Li, C., Gao, L., & Wang, A. (2015). High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4015-4021. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3930>





Article

ApoA-I Nanoparticles as Curcumin Carriers for Cerebral Endothelial Cells: Improved Cytoprotective Effects against Methylglyoxal

Sai Sandhya Narra ¹, Sarah Rosanaly ¹, Philippe Rondeau ¹, Jessica Patche ¹, Bryan Veeren ¹, Marie-Paule Gonthier ¹, Wildriss Viranaicken ², Nicolas Diotel ¹, Palaniyandi Ravanan ³, Christian Lefebvre d' Hellencourt ¹ and Olivier Meilhac ^{1,4,*}

- ¹ INSERM UMR 1188, Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DéTROi), Université de La Réunion, 97490 Saint-Denis, La Réunion, France; narra.sai-sandhya@univ-reunion.fr (S.S.N.); sarah.rosanaly@univ-reunion.fr (S.R.); philippe.rondeau@univ-reunion.fr (P.R.); jessica.patche@univ-reunion.fr (J.P.); bryan.veeren@univ-reunion.fr (B.V.); marie-paule.gonthier@univ-reunion.fr (M.-P.G.); nicolas.diotel@univ-reunion.fr (N.D.); christian.lefebvre-d-hellencourt@univ-reunion.fr (C.L.d.H.)
- ² Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, INSERM UMR 1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Plateforme Technologique CYROI, 94791 Sainte Clotilde, La Réunion, France; wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr
- ³ Department of Microbiology, School of Life Sciences, Central University of Tamil Nadu, Thiruvavur 610005, India; ravanan@cutn.ac.in
- ⁴ Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de La Réunion, CIC 1410, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France
- * Correspondence: olivier.meilhac@inserm.fr; Tel.: +33-262-693406545



Citation: Narra, S.S.; Rosanaly, S.; Rondeau, P.; Patche, J.; Veeren, B.; Gonthier, M.-P.; Viranaicken, W.; Diotel, N.; Ravanan, P.; Hellencourt, C.L.d.; et al. ApoA-I Nanoparticles as Curcumin Carriers for Cerebral Endothelial Cells: Improved Cytoprotective Effects against Methylglyoxal. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 347. <https://doi.org/10.3390/ph15030347>

Academic Editor: Alfredo Berzal-Herranz

Received: 10 February 2022

Accepted: 9 March 2022

Published: 13 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Methylglyoxal (MGO) is a highly reactive metabolite of glucose present at elevated levels in diabetic patients. Its cytotoxicity is associated with endothelial dysfunction, which plays a role in cardiovascular and cerebrovascular complications. Although curcumin has many therapeutic benefits, these are limited due to its low bioavailability. We aimed to improve the bioavailability of curcumin and evaluate a potential synergistic effect of curcumin and reconstituted high-density lipoprotein (rHDL) nanoparticles (Cur-rHDLs) on MGO-induced cytotoxicity and oxidative stress in murine cerebrovascular endothelial cells (bEnd.3). Cur-rHDL nanoparticles (14.02 ± 0.95 nm) prepared by ultracentrifugation and containing curcumin were quantified by LC–MS/MS. The synergistic effect of cur-rHDL nanoparticles was tested on bEnd.3 cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS) production, chromatin condensation, endoplasmic reticulum (ER) stress, and endothelial barrier integrity by impedancemetry. The uptake of curcumin, alone or associated with HDLs, was also assessed by mass spectrometry. Pretreatment with Cur-rHDLs followed by incubation with MGO showed a protective effect on MGO-induced cytotoxicity and chromatin condensation, as well as a strong protective effect on ROS production, endothelial cell barrier integrity, and ER stress. These results suggest that Cur-rHDLs could be used as a potential therapeutic agent to limit MGO-induced dysfunction in cerebrovascular endothelial cells by enhancing the bioavailability and protective effects of curcumin.

Keywords: nanoparticle; curcumin; HDL; methylglyoxal; cerebral endothelial cells; endothelial dysfunction

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a global health issue that increases the risk of cardiovascular and cerebrovascular diseases, including ischemic stroke and its hemorrhagic complications. Prolonged hyperglycemia leads to various biochemical modifications, such as oxidative stress, apoptosis, and glycation, particularly mediated by methylglyoxal (MGO), a physiological reactive carbonyl compound derived from glucose metabolism. High concentrations of MGO and MGO-derived products are found in the plasma of diabetic patients and are

associated with diabetic complications [1–3]. Increased plasma MGO levels have been shown to be associated with cardiovascular disease and mortality in T2D patients [4]. MGO induces massive intracellular oxidative stress, particularly in endothelial cells (ECs) at the interface between blood and different tissues. This reactive compound is a precursor of advanced glycation products (AGEs) but has a greater potential than AGEs or glucose itself to induce vascular damage [5]. MGO has been shown to be cytotoxic to different types of ECs, including human umbilical vein ECs (HUVECs) and cerebral ECs [6,7]. It was shown to induce endoplasmic reticulum stress (ER stress) that may lead to apoptosis [5]. To prevent MGO- or high-glucose-induced oxidative stress and resulting cytotoxicity, various antioxidants have been used, such as proanthocyanidins [8], isorhamnetin [7], resveratrol [9], and pterostilbene, a natural derivative of resveratrol [10]. Curcumin, a potent but hydrophobic antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic compound, has been used to limit MGO-induced cytotoxicity in different cell types such as mouse embryonic stem cells [11] and human hepatoma cells [12] but not in ECs. In the present study, we sought to test the protective effect of curcumin on MGO-induced intracellular oxidative stress and cytotoxicity in cerebral ECs. We also tested the capacity of curcumin to limit the increase in endothelial permeability induced by MGO by monitoring real-time cell impedance. Despite its numerous neuroprotective effects, curcumin has limited bioavailability and poor solubility. Our second objective was to improve curcumin bioavailability by loading it into Apolipoprotein A-I phospholipid nanoparticles (also called reconstituted high-density lipoproteins-rHDLs) and test the potential synergistic effect of curcumin and HDLs versus HDLs or curcumin alone. HDL particles themselves have pleiotropic properties similar to those of curcumin (antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects). In particular, HDL treatment limits infarct volume and mortality in different models of ischemic stroke via endothelial protective effects [13,14]. In the present study, we tested a potential synergistic effect of rHDLs and curcumin on MGO-induced oxidative stress, endothelial permeability, and cytotoxicity in cerebral endothelial cells.

2. Results

2.1. Particle Size Distribution of rHDL and Cur-rHDLs by DLS Analysis

Dynamic light scattering was used to determine the particle size distribution of rHDLs and Cur-rHDLs. The particle average size was determined to be 12.55 ± 0.21 nm for rHDLs and 14.02 ± 0.95 nm for Cur-rHDLs, as shown in Figure 1a,b respectively. A polydispersity index (PDI) near to zero implies homogeneity of dispersions, and a PDI greater than 0.3 indicates heterogeneity [15]. The PDI of our Cur-rHDL nanoparticles was around 0.25. The incorporation of curcumin did not significantly affect the size of the rHDL particles ($p > 0.05$, comparing Cur-rHDL to rHDL particle size).

2.2. Effect of HDL and Curcumin on Cerebrovascular Endothelial Cell Cytotoxicity Induced by MGO

MGO is known to be cytotoxic to endothelial cells, but MGO cytotoxicity has never been evaluated in bEnd.3 cells [4,7]. Cell viability was determined by the MTT assay after incubation with different concentrations of MGO for 24 h. MGO showed concentration-dependent cytotoxicity with decreased cell viability of approximately 20% and 70% at 1 mM and 2 mM, respectively (Figure 2a). These results are in agreement with previously published results of MGO cytotoxicity [16]. Next, we investigated the effect of rHDLs (H) and curcumin (C) on MGO cytotoxicity in cerebral endothelial cells by pretreating the cells with different concentrations of rHDLs and curcumin for 1 h and then adding 2 mM MGO for 24 h. Reconstituted HDLs were not cytotoxic but showed a cytoprotective effect on MGO-induced cell death in a concentration-dependent manner. While low rHDL concentrations of 5–50 $\mu\text{g/mL}$ were not cytoprotective, higher concentrations ranging from 100 to 200 $\mu\text{g/mL}$ were significantly cytoprotective (Figure 2b). On the other hand, curcumin started to be protective at 0.2 and 0.4 μM but was not effective at 0.1 μM and was

potentially cytotoxic at higher doses (0.8, 1m and 2 μ M), with a loss of the cytoprotective effect (Figure 2c).

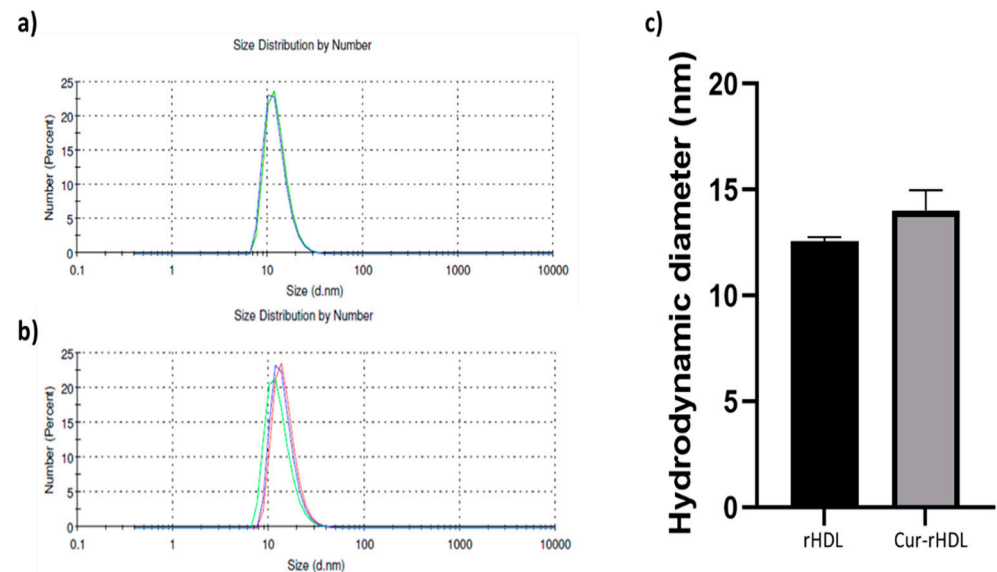


Figure 1. Particle size distribution of rHDLs and Cur-rHDLs determined by DLS analysis. The samples were prepared in PBS at 1 mg/mL. (a) Size distribution of rHDLs and (b) Cur-rHDLs and (c) Histograms representing the hydrodynamic particle diameter of rHDLs and Cur-rHDLs. Data are presented as the mean $\pm$ SD of three independent measurements for each sample.

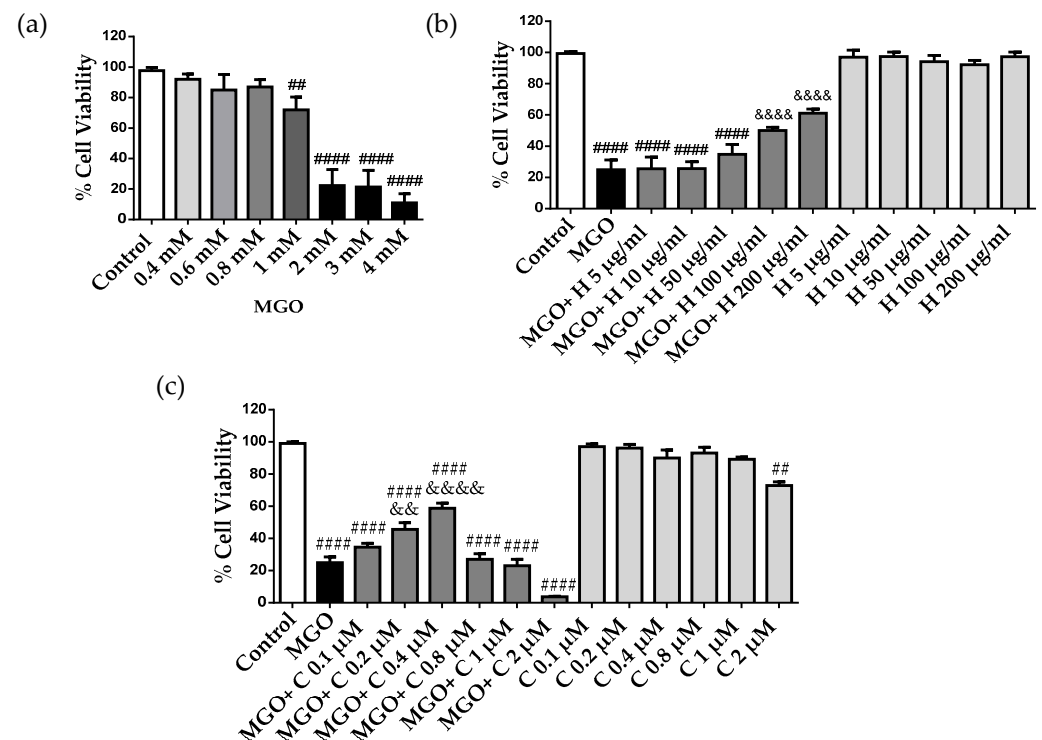


Figure 2. MGO cytotoxicity in bEnd3 cerebral endothelial cells, effect of rHDLs (H) and curcumin (C). (a) The cells were treated with different MGO concentrations (0.4–4 mM) for 24 h. (b) The cells were pre-treated with different concentrations of rHDLs, 5–200 μ g/mL, (H) and (c) curcumin (C), 0.1–2 μ M, for 1 h, followed by the addition of 2 mM MGO for 24 h. Cell viability was assessed by the MTT assay. Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ as compared to control. && $p < 0.01$, &&&& $p < 0.0001$ as compared to MGO.

2.3. Effect of Curcumin-Enriched rHDLs on MGO Cytotoxicity in Cerebral Endothelial Cells

Given that rHDLs (H) and curcumin (C) alone showed a cytoprotective effect, we tested the synergistic effect of curcumin and rHDLs (Cur-rHDL) on the cytotoxicity of MGO. For this purpose, the cells were pre-treated with rHDLs (H), curcumin (C), or curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDL) for 1 h before the addition of 2 mM MGO. Cur-rHDLs contained 50 to 80 $\mu\text{g/mL}$ ApoA-I and 0.03 to 0.048 μM curcumin, concentrations that were not protective when rHDLs and curcumin were used alone to prevent MGO cytotoxicity. At these concentrations, Cur-rHDLs were not cytotoxic. The cytoprotective effect was not observed at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ rHDL enriched with 0.03 μM curcumin either alone or in combination (Figure 3a). In contrast, concentrations of 80 $\mu\text{g/mL}$ rHDL and 0.048 μM curcumin showed a synergistic cytoprotective effect compared to rHDL and curcumin alone in the presence of MGO (Figure 3b). Similarly, 100 $\mu\text{g/mL}$ of rHDLs enriched with 0.06 μM curcumin and 200 $\mu\text{g/mL}$ of rHDLs enriched with 0.12 μM curcumin showed an enhanced cytoprotective effect relative to curcumin and rHDLs alone, which were already cytoprotective at these concentrations (Figure 3c,d respectively).

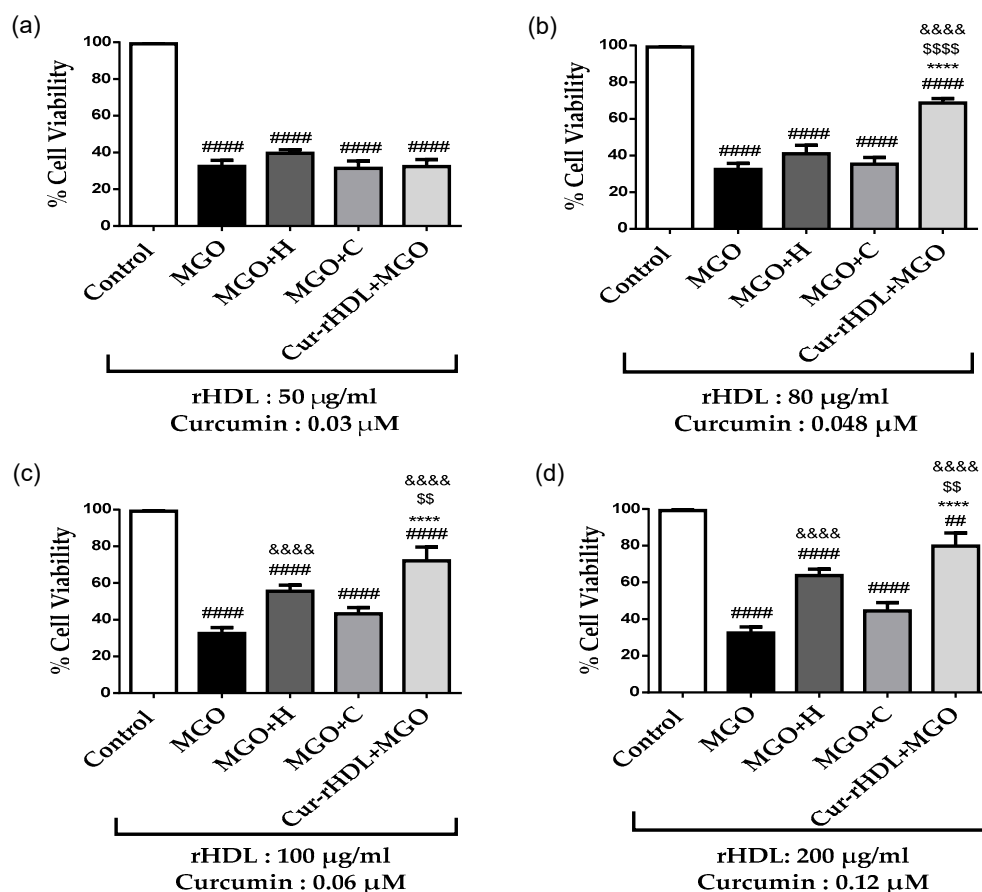


Figure 3. Effect of curcumin-enriched rHDLs on MGO cytotoxicity in cerebral endothelial cells. The cells were pre-treated with different concentrations of rHDLs (H), curcumin (C), and curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) for 1 h before the addition of 2 mM MGO for 24 h. (a) H: 50 $\mu\text{g/mL}$, C: 0.03 μM and Cur-rHDL: 50 $\mu\text{g/mL}$ + 0.03 μM . (b) H: 80 $\mu\text{g/mL}$, C: 0.048 μM and Cur-rHDLs: 80 $\mu\text{g/mL}$ + 0.048 μM . (c) H: 100 $\mu\text{g/mL}$, C: 0.06 μM and Cur-rHDLs: 100 $\mu\text{g/mL}$ + 0.06 μM (d) H: 200 $\mu\text{g/mL}$, C: 0.12 μM and Cur-rHDLs: 200 $\mu\text{g/mL}$ + 0.12 μM . Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). #### $p < 0.0001$, ## $p < 0.01$ as compared to control, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.0001$ as compared to MGO+H, &&&& $p < 0.0001$ as compared to MGO and **** $p < 0.0001$ as compared to MGO+C.

2.4. Effect of Curcumin-Enriched rHDLs on Cerebral Endothelial Layer Integrity

To investigate the integrity of the endothelial layer, the cells were treated with different concentrations of MGO (0.8, 1, and 2 mM), and the cell real-time electrical impedance was measured using the xCELLigence system. Cerebral endothelial cell integrity was not affected by MGO at 0.8 mM and 1 mM but was altered at 2 mM, resulting in a decreased impedance compared to the control (Figure 4a). This is consistent with the cytotoxic effect of MGO at 2 mM observed by the MTT assay (Figure 2a). We further tested the effect of curcumin-enriched rHDLs on MGO-induced reduction of impedance. These results showed a synergistic protective effect on the integrity of the cerebral endothelial cell monolayer impaired by MGO, whereas individually, rHDLs and curcumin were not protective (Figure 4b). This suggests that curcumin-enriched rHDLs contribute to protecting the integrity of cerebral endothelial cells from the cytotoxic effects of MGO.

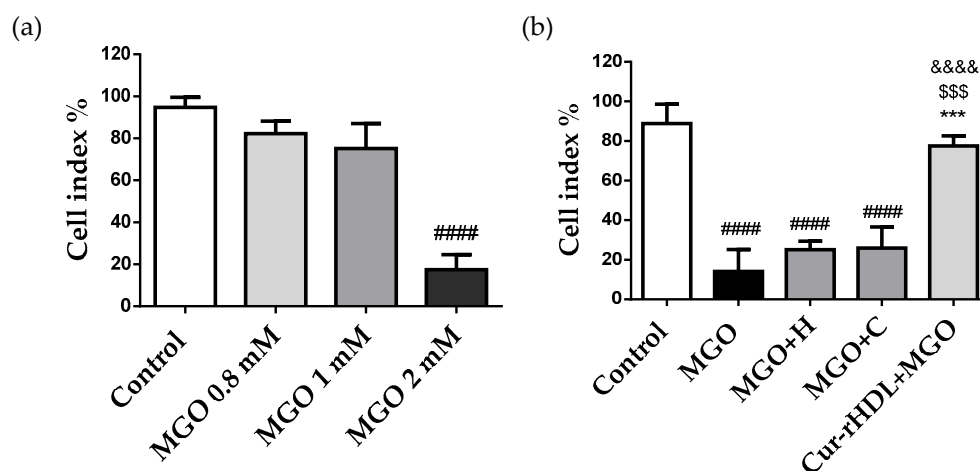


Figure 4. Effect of curcumin-enriched rHDLs on the cerebral endothelial cell monolayer integrity assessed by the measurement of electrical impedance. (a) The cells were treated with different MGO concentrations (0.8–2 mM). (b) The cells were pre-treated with HDL (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), curcumin (0.048 μM), curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.048 μM) for 1 h before the addition of 2 mM MGO. The cell index was measured as electrical impedance generated by cell attachment and proliferation detected by electrodes present at the bottom of the plate. Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). ##### $p < 0.0001$ as compared to control, \$\$\$ $p < 0.001$ as compared to MGO+H, *** $p < 0.001$ as compared to MGO+C and &&&& $p < 0.0001$ as compared to MGO.

2.5. Effect of Curcumin-Enriched rHDLs on Intracellular ROS Production Induced by MGO in Cerebral Endothelial Cells

We then evaluated the effect of curcumin-enriched rHDLs on intracellular reactive oxygen species (ROS) production in the presence of MGO by DCFH-DA fluorimetry. The cells were pretreated with rHDLs, curcumin, and Cur-rHDLs for 1 h before the addition of 2 mM MGO from 1 to 6 h. MGO increased the intracellular ROS production as early as 2 h, which peaked at 3 h and started to decrease slightly at 4–6 h, while remaining above that in the control. Curcumin-enriched rHDLs limited significantly MGO-induced ROS production compared to rHDLs and curcumin alone (except for rHDL at 5 h that showed a significant ROS reduction) (Figure 5).

2.6. Effect of Curcumin-Enriched rHDLs on MGO-Induced Chromatin Condensation in Cerebral Endothelial Cells

We then investigated the effect of curcumin-enriched rHDLs on MGO-induced chromatin condensation in cerebral endothelial cells by DAPI staining. MGO induced chromatin condensation that was significantly reduced by pre-treatment with curcumin-enriched

rHDLs, whereas rHDLs and curcumin alone showed no significant protective effect (Figure 6a,b).

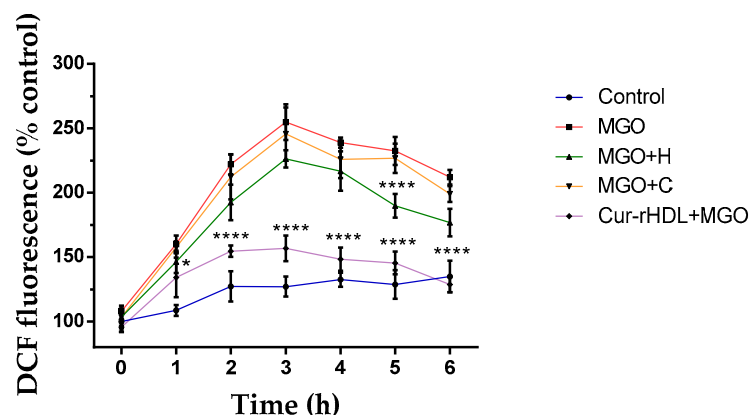


Figure 5. Effect of curcumin-enriched rHDLs on intracellular ROS production induced by MGO in cerebral endothelial cells evaluated by the DCFH-DA assay. The cells were pretreated with rHDLs (H-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), curcumin (C-0.048 μM), and curcumin-enriched rHDLs (H+C-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.048 μM) for 1 h before the addition of 2 mM MGO for 1–6 h. Intracellular ROS were quantified by the measurement of DCFH-DA fluorescence. Data are represented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ as compared to MGO.

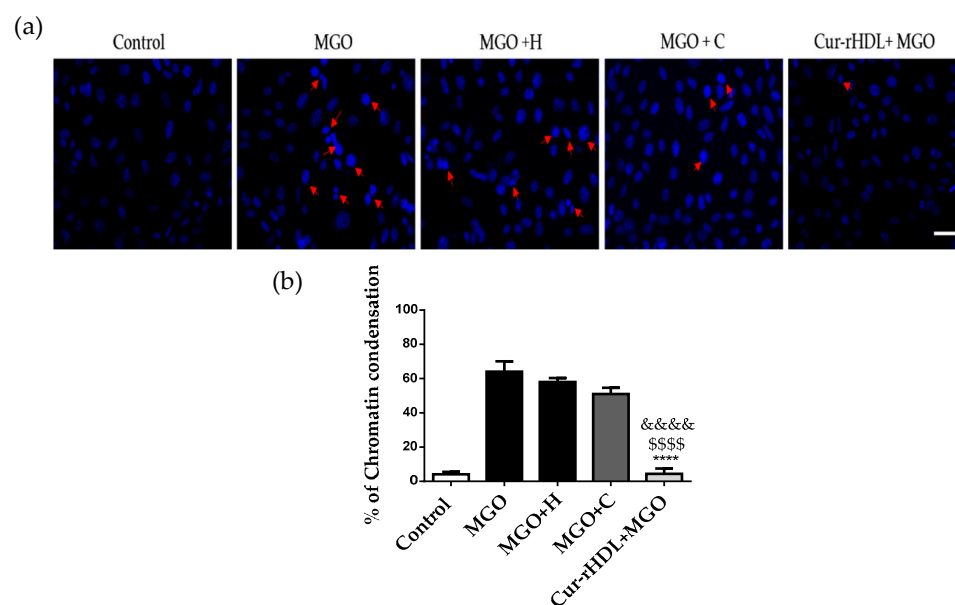


Figure 6. Effect of curcumin-enriched rHDLs on chromatin condensation induced by MGO in cerebral endothelial cells by DAPI staining. (a) DAPI staining images; the cells were treated with rHDLs (H-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), curcumin (C-0.048 μM), and curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDL-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.048 μM) before the addition of 2 mM MGO for 24 h. Red arrows indicate a typical example of chromatin condensation. (b) The results were obtained by counting the number of cells with condensed chromatin. Scale bar: 60 μm . Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). \$\$\$\$ $p < 0.0001$ as compared to MGO+H, **** $p < 0.0001$ as compared to MGO+C and &&&& $p < 0.0001$ as compared to MGO.

2.7. Effect of Curcumin-Enriched rHDLs on MGO-Induced ER Stress in Cerebral Endothelial Cells

The effect of curcumin-enriched rHDLs on MGO-induced ER stress was assessed by immunofluorescence. During ER stress, Xbp-1 and ATF-4 are translocated into the nucleus, whereas GRP-78 levels increase. Nuclear translocation of Xbp-1 and ATF-4, as well as

increased levels of GRP-78, were observed upon MGO exposure, similar to what seen in the presence of thapsigargin, which is a well know ER stress inducer. Pre-treatment with rHDLs or curcumin alone did not have a significant effect on these ER stress markers, whereas curcumin-enriched rHDLs prevented the nuclear translocation of Xbp-1 (Figure 7a) and ATF-4 (Figure 7b) and decreased the levels of GRP-78 (Figure 7c). This suggests that curcumin-enriched rHDLs have a protective effect on MGO-induced ER stress.

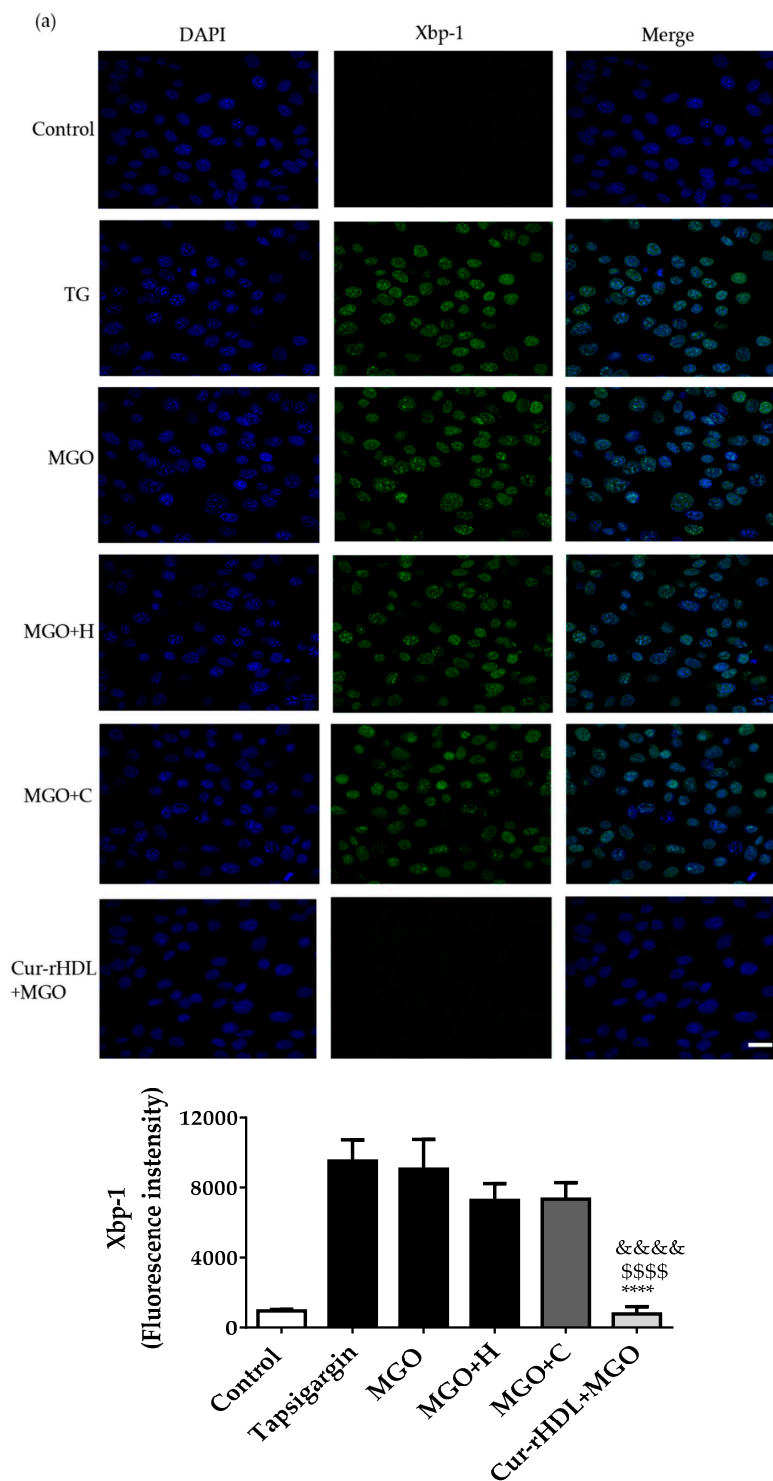


Figure 7. Cont.

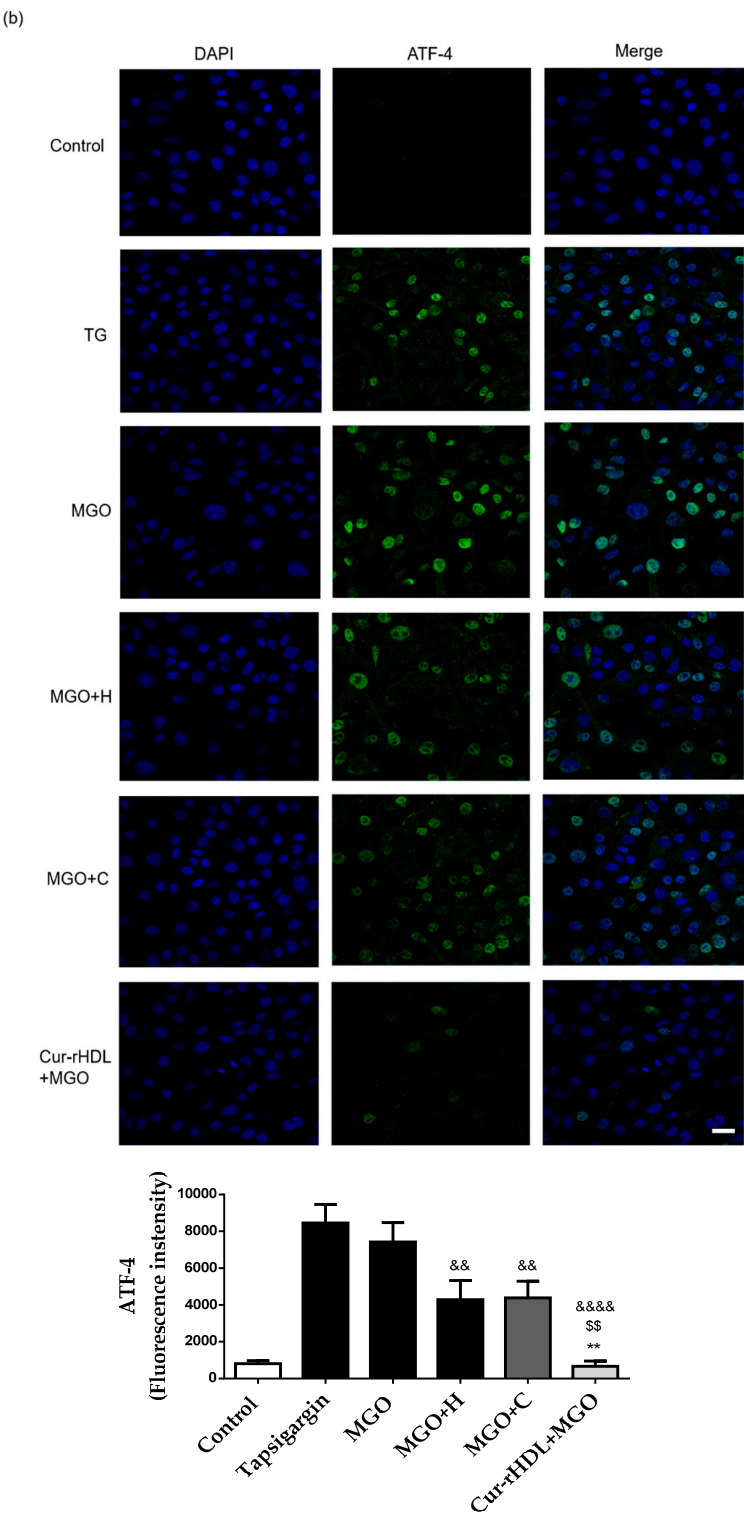


Figure 7. Cont.

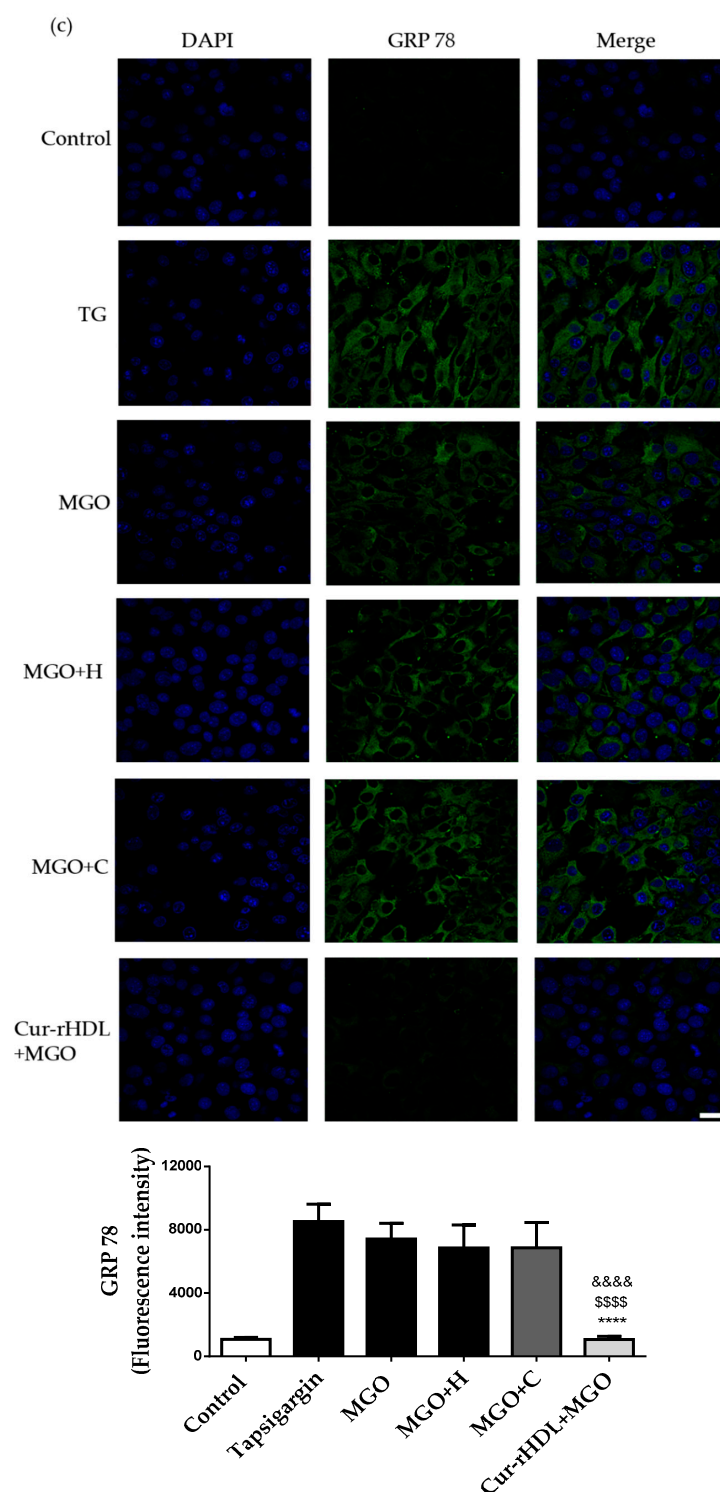


Figure 7. Effect of curcumin-enriched rHDLs on ER stress induced by MGO in cerebral endothelial cells assessed by immunohistochemistry analysis. (a) Confocal microscopy images of the nuclear translocation of Xbp-1, (b) ATF-4, and (c) GRP 78 markers. The cells were treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ of thapsigargin, used as positive control for ER stress (TG), 2 mM methylglyoxal (MGO), pretreated with rHDLs (H, 80 $\mu\text{g/mL}$), curcumin (C, 0.048 μM), or curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDL, 80 $\mu\text{g/mL}$ + 0.048 μM) before the addition of 2 mM MGO for 6 h. Scale bar: 24 μm . Data are presented as mean $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$\$ $p < 0.0001$ as compared to MGO+H, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ as compared to MGO+C and && $p < 0.01$, &&&& $p < 0.0001$ as compared to MGO.

2.8. Quantification of Cellular Curcumin after Incubation of bEnd 3 Cells with Curcumin-Enriched rHDLs or Curcumin Alone

We evaluated the cellular uptake of free curcumin compared to that of Cur-rHDLs by bEnd 3 cells to understand the impact of encapsulation on curcumin uptake. The uptake of curcumin was assessed by mass spectrometry. bEnd.3 cells were incubated with free curcumin or curcumin-enriched rHDLs for 3 and 6 h. The intracellular uptake of free curcumin was faster and higher than that of curcumin-enriched rHDLs at both 3 and 6 h. The uptake of free curcumin was similar at 3 and 6 h, whereas curcumin-enriched rHDL uptake was greater at 3 h and decreased at 6 h, suggesting saturation of the HDL uptake process (Figure 8).

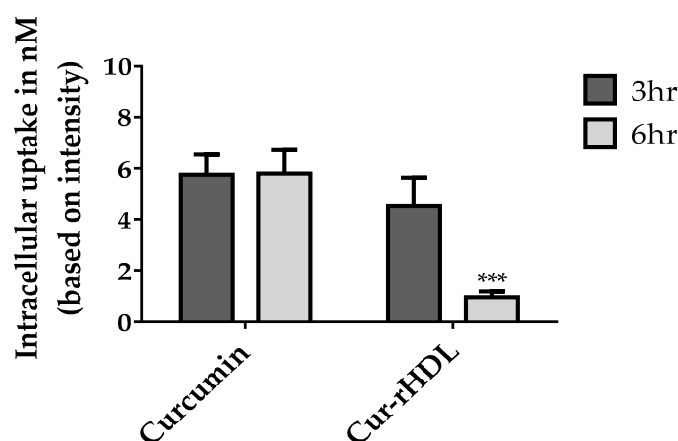


Figure 8. LC–MS/MS analysis of curcumin uptake in cerebral endothelial cells after incubation (3–6 h) with curcumin-enriched rHDLs or curcumin alone. The samples were prepared and analyzed by LC–MS/MS as described in the materials and methods. Data are presented as $\pm$ SD of three independent experiments ($n = 3$). *** $p < 0.001$ as compared to curcumin.

3. Discussion

Most diseases involve an imbalance between free radical and antioxidant responses leading to oxidative stress. This is notably the case in diabetes and its cardiovascular and cerebrovascular complications. Methylglyoxal (MGO) is a highly reactive metabolite of glucose metabolism whose levels are increased in type II diabetic patients. It has been shown to accumulate in the brain of mice deficient for glyoxalase 1/vitamin B6 (MGO detoxification system), suggesting that this imbalance is particularly critical for MGO accumulation in the brain [17]. Studies have shown that the dysfunction of the glyoxalase system is related to several diabetic complications, including macrovascular diseases in humans [18]. As vascular dysfunction plays an important role in diabetes-associated vascular complications, several studies have been conducted to understand the effect of MGO on endothelial dysfunction [19,20]. Many antioxidants are used to reduce MGO cytotoxicity, such as resveratrol, curcumin, and luteolin, but their use is limited by their poor solubility and bioavailability. Improving the bioavailability of antioxidant molecules to reach the cells or tissues of interest and their therapeutic benefits in the body remains a topic of intense research.

The present study aimed to test the ability of curcumin and rHDLs to limit MGO-induced oxidative stress, cytotoxicity, and endoplasmic reticulum (ER) stress in murine cerebral endothelial cells (bEnd 3). In a second step, the potential synergistic effect of curcumin- and rHDLs, which could improve curcumin bioavailability, was also evaluated on the same processes. For this purpose, rHDLs were enriched with curcumin and then re-isolated by ultracentrifugation to remove unincorporated free curcumin. The average particle size of Cur-rHDLs was determined to be 14.02 ± 0.95 nm. MGO was cytotoxic (2 mM) in our cerebral endothelial cell model and, previously, was also shown to be cytotoxic in different cell lines including neuroglial cells, HUVECs, and human brain endothelial cells [7,21,22].

MGO also induced reactive oxygen species (ROS) formation [23,24], blood–brain barrier (BBB) hyperpermeability [25,26], chromatin condensation, and ER stress [27,28], as shown in previous studies.

MGO damage and cytotoxicity in endothelial cells (ECs) is mediated by oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) formation [24]. Previous studies have shown that many compounds reduce MGO cytotoxicity in endothelial cells via reducing ROS formation. MGO is known to increase ROS production, associated with the weakening of barrier integrity. MGO was shown to promote oxidative stress in brain endothelial cells [16].

Previous studies have shown that MGO leads to increased permeability of brain endothelial cells. This study reported that the decrease of transendothelial electrical resistance by MGO was associated with alterations in tight junction proteins, such as glycation of occludin and redistribution of zonula occludens-1 (ZO-1). MGO treatment also induced the redistribution of claudin-5 and of the adherens junction protein β -catenin in brain endothelial cells [25]. Claudin-5 is the major regulatory protein of BBB permeability [29]. MGO induced the activation of UPR signaling and apoptosis in HUVECs via AMPK, PI3K–AKT, and CHOP induction pathways [30,31]. The mechanism of ER stress inhibition by curcumin is not well known but it has been shown to reduce ER stress responses by increasing peroxiredoxin 6 (prdx 6), decreasing NF- κ B signaling, and reducing oxidative stress [32,33].

The curcumin metabolites, glucuronides and di-tetra- and hexahydrocurcumins were detected in the liver, kidney, and intestines after oral, intraperitoneal (IP), and intravenous (IV) administrations. The oral administration of curcumin showed reduced bioavailability and poor absorption compared to IV or IP administrations [34]. The IP administration of curcumin allowed a wide biodistribution including to the brain, lungs, liver, and kidney. Nanoemulsions of curcumin are reported to improve the bioavailability and therapeutic effects of this molecule compared to free curcumin in both in vitro and in vivo studies [35].

Interestingly, our curcumin-enriched rHDL (Cur-rHDLs) nanoparticles showed an improved synergistic protective effect on MGO-induced cytotoxicity, ROS production, cerebral endothelial cell integrity, chromatin condensation, and ER stress compared to rHDLs or curcumin alone. Anti-apoptotic effects of curcumin in MGO-stimulated endothelial cells have been previously reported. The authors suggested potential direct scavenging of MGO by curcumin and one of its analogues, dimethoxy curcumin [36]. However, the protection by HDLs from MGO-induced endothelial cell death had never been reported before. Here, we provide the first evidence that reconstituted HDL particles exhibit sufficient antioxidant and anti-inflammatory effects to prevent MGO-induced cell death in endothelial cells.

Recently, the bioavailability of curcumin was improved using nanoemulsions administered intraperitoneally in a mouse model of Parkinson's disease [36]. Poloxamer nanoparticles (nonionic triblock copolymers) displayed better penetration of the blood–brain barrier and better accumulation in the brain than non-encapsulated curcumin in subjects with Alzheimer's disease [37]. Previous studies on curcumin encapsulated in low-density lipoprotein (LDL) and HDL particles showed that LDLs were more prone to accumulate curcumin than HDL particles and highlighted their potential to treat cancer, due to the avidity of cancer cells for LDLs [38].

A previous study showed that HDLs reconstituted with soy phosphatidylcholine and Apolipoprotein A-I isolated from the plasma of healthy volunteers significantly reduced the infarct area in two rat models of stroke and had an antioxidant effect in human endothelial and neuroblastoma cell lines [39]. The HDL drug delivery system facilitates the cellular uptake of drugs via interaction with scavenging receptors (SR-BI) by bypassing the endosomal/lysosomal pathway, independently of HDL uptake by transcytosis. Cerebral endothelial cells (including bEnd.3) contain SR-BI class B type I receptors in their membranes. rHDLs injected intraperitoneally were detected in the liver and kidney in in vivo mouse and zebrafish models [40]. rHDLs were also shown to be taken up by endothelial cells and astrocytes in the brain of mice subjected to experimental ischemic stroke. We

recently demonstrated that HDLs isolated from plasma had a neuroprotective effect via SR-BI (scavenger receptor type BI) in a mouse model of MCAO [13]. Improvement of HDL potential to prevent the deleterious effects of stroke in diabetic conditions is of major importance, since our preliminary results tend to demonstrate that HDLs alone are not sufficient to limit infarct volume and hemorrhagic complications in a mouse model of stroke under hyperglycemic conditions [41]. Curcumin-enriched HDLs could then represent a therapeutic option for brain pathologies involving oxidative stress and BBB dysfunction. Nano-curcumin administered orally was shown to have a good brain biodistribution in a mouse model of experimental cerebral malaria [13].

4. Materials and Methods

Methylglyoxal (MGO), curcumin (Cat. Number: C7727), propidium iodide (PI), thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), and other chemicals were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

4.1. Cell Culture

The murine cerebral endothelial cell line bEnd.3 was obtained from the American Type Culture Collections (ATCC® CRL™-2299™, Manassas, VA, USA). The cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 25 mM glucose, 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 5 mM L-glutamine, 2 µg/mL streptomycin, and 50 µU/mL penicillin (Pan Biotech, Dutscher, and Brumath, France). The cells were kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂, at 37 °C. All the treatments were carried out in serum-free medium.

4.2. Preparation of Curcumin-Enriched rHDLs (Cur-HDLs)

Reconstituted HDLs (rHDLs) were obtained from CSL Behring AG (CSL111, Bern, Switzerland). rHDLs enriched with curcumin were prepared by gently mixing 3 mL of 2 mg/mL rHDLs with 5 µM curcumin followed by incubation in the dark for 16 h at 37 °C (50 rpm). Curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) were isolated by ultracentrifugation as described previously [13] to eliminate free curcumin. Briefly, the rHDL curcumin mixture was adjusted to a density $d = 1.22$ with KBr and overlaid with a KBr saline solution ($d = 1.21$). Ultracentrifugation was performed at $100,000 \times g$ for 24 h at 10 °C. The curcumin-enriched rHDL yellow fraction (top layer) was recovered. The curcumin-enriched rHDL fraction was desalted by centrifugation with PBS 5 times, 20 min each, at $12,000 \times g$ using a Centricon filter (cutoff 10 kDa; Vivascience, Stonehouse, UK) to remove the excess of KBr and concentrate the sample. Protein concentration was determined using the Bicinchoninic Acid (BCA) method (BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Pierce, and Waltham, MA, USA).

4.3. Quantification of Curcumin by LC-MS Analysis

4.3.1. Extraction of Curcumin from HDL-Curcumin

Curcumin was extracted from Cur-HDLs by precipitation of ApoA-I with acetonitrile (ACN). In brief, 54 µL of ACN was added to 27 µL of the Cur-HDL solution (2:1, v/v), vortexed a few seconds, and centrifuged at $20,000 \times g$ for 15 min. The resulting supernatant was collected and directly analyzed by mass spectrometry.

4.3.2. Identification and Quantification of HDL-Curcumin by LC-MS/MS

Curcumin from Cur-HDLs was identified by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a HESI-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive™ Plus, Thermo Fisher). Briefly, 10 µL of sample was injected in a UHPLC system equipped with a Thermo Fisher Ultimate 3000 series WPS-3000 RS autosampler and then separated on a PFP column (2.6 µm, 100 mm $\times$ 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Elution was performed using a binary gradient of water and ACN, both acidified with 0.1% formic acid (B). A flow rate of 450 µL/min was used. The following elution was setup: 0.0–3.0 min, from 20 to 50%

B; continue with 50% B for 8 min. Then, the column was washed with 95% B for 3 min and equilibrated with 20% B for 2 min. The column oven was thermostated at 30 °C.

For mass spectrometry conditions, the Heated Electrospray Ionization source II was set at 3.9 kV, the capillary temperature at 320 °C, the sheath gas flow rate at 65 units, the auxiliary gas flow rate at 20 units, and the S-lens RF at 50%. Mass spectra were registered in full scan data-dependent acquisition from m/z 100 to 500 in positive ion mode at a resolving power of 70,000 FWHM (at m/z 400). The automatic gain control (AGC) was set at $1e6$, and the injection time (IT) at 200 ms. The MS/MS spectra were acquired at a resolving power of 17,500 FWHM (at m/z 200) with an AGC set to $2e5$ and an IT of 50 ms. A relative higher energy collisional dissociation (HCD) energy of 40% was applied. Identification and quantification of curcumin were based on its retention time, accurate mass, elemental composition, MS fragmentation pattern, and comparisons with a commercial standard. Data were acquired by XCalibur 4.2.47 software (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) and processed by Skyline 21.1.0.146 software (MacCoss Lab.). The performance of the Orbitrap was evaluated weekly, and external calibration of the mass spectrometer was performed before analysis with an LTQ ESI positive ion calibration solution (Pierce™).

4.3.3. Preparation of Standard Solution and Calibration Curve

The standard stock solution of curcumin was dissolved in DMSO at a concentration of 100 μM . Calibration standard solutions were prepared by dilution of the stock solution in 20% ACN acidified with 0.1% formic acid to obtain the desired calibration curves ranging from 0.0156 to 2 μM . The calibration curves were constructed by plotting the peak area of the analytes against the corresponding analyte concentrations with linear regression ($1/x$ weighting, linear through zero) using standard samples at six concentrations. The obtained calibration curve had a correlation coefficient (R^2) of 0.989. The concentration of curcumin from the Cur-HDLs was $2.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$ (Figure 9).

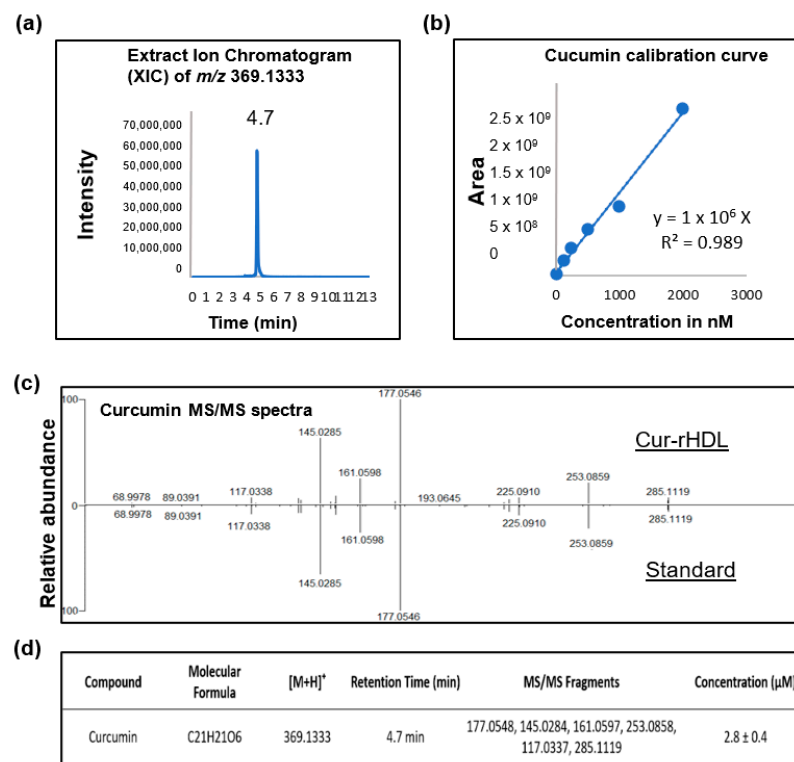


Figure 9. Quantification of curcumin in curcumin-enriched rHDLs by LC-MS/MS analysis. (a) Representative ion chromatogram of curcumin, (b) Calibration curve used to quantify curcumin, (c) LC-MS/MS analysis spectrum of curcumin in the Cur-rHDL sample vs. the curcumin standard and (d) Combined LC-MS/MS analysis details of curcumin quantification.

4.4. Determination of Particle Size

The particle size of rHDLs and Cur-rHDLs was determined using a dynamic light scattering (DLS) particle size analyzer (Zetasizer Nano, Malvern Instruments, UK), which measures the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of the nanoparticles. The analysis was performed at 25 °C with a scattering angle of 173°. The rHDL and Cur-rHDL samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL in PBS and filtered through a 0.22 µm-pore size PTFE syringe filter (to remove any aggregates).

4.5. Evaluation of Cell Viability

Cell viability was evaluated by assessment of mitochondrial metabolic activity via the MTT assay (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) as previously described [42]. The cells were seeded in 96-well plates at a density of 5×10^3 cells per well and grown for 24 h. The culture medium was removed, and the cells were washed once with PBS. The cells were then incubated with HDLs (H), curcumin (C), curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) for 1 h before the addition of 2 mM MGO for 24 h. After 24 h, 20 µL of 5 mg/mL MTT reagent prepared in PBS was added to each well, and the cells were incubated in the dark at 37 °C for 2 h. Then, the medium was removed, the formed formazan crystals were dissolved in 100 µL DMSO, and the absorbance was measured at 570 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

4.6. Evaluation of Intracellular ROS

The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured using the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetate (DCFH-DA) as described previously [42]. The cells were seeded in a black 96-well plate with a transparent bottom at a cell density of 5×10^3 cells for 24 h. The medium was removed, and 100 µL of a 10 µM DCFH-DA solution in PBS was added to each well after washing the cells with PBS. After 40 min of incubation in the dark at 37 °C, the probe was removed and the cells were pre-treated with rHDLs (H), curcumin (C), curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) for 1 h, before addition of 2 mM MGO for 1–6 h. ROS levels were measured by fluorescence analysis at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 520 nm (FLUOstar Optima, Bmg Labtech, and Cambridge, UK).

4.7. Assessment of Endothelial Layer Integrity by Real-Time Electrical Impedance

The cellular integrity was analyzed by impedance measurement using the xCELLigence system (Acea Biosciences, San Diego, CA, USA). The cells were seeded in a 16-well xCELLigence plate specifically designed for monitoring the impedance, at a cell density of 4×10^3 cells per well. After the cells reached confluency, they were pre-treated with rHDLs (H), curcumin (C), and curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) for 1 h before the addition of 2 mM MGO. The impedance was monitored for 4 days.

4.8. Evaluation of Chromatin Condensation

Chromatin condensation was evaluated using the fluorescent dye DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole). The cells were seeded on sterile 14 mm coverslips placed in a 24-well plate at a density of 5×10^3 per well for 24 h. The culture medium was removed 24 h after the different treatment, and the cells were washed with PBS and fixed in 4% PFA for 10 min. The cells were then stained with DAPI (1 µg/mL) for 5 min and washed twice with PBS, and the coverslips were mounted on slides. The number of cells with condensed chromatin was determined using a fluorescent microscope (Eclipse 80i Nikon microscope equipped with a Hamamatsu digital camera, Life Sciences, Tokyo, Japan). The results are expressed as percentage of cells with condensed chromatin.

4.9. Immunocytochemistry

Cells were seeded in a 24-well plate containing 14 mm-diameter coverslips at a density of 5×10^3 per well for 24 h. After treatment, the cells were washed and fixed

in 4% PFA (for ATF-4 primary antibody staining) for 5 min at room temperature or 100% ice-cold (-20°C) methanol (for XBP-1 and GRP 78 primary antibodies staining) for 10 min and then incubated with the primary antibodies ATF-4 (Cell signaling technology-11815S, Danvers, MA; dilution 1:200–500 ng/mL), XBP-1 (Abcam-ab37152, Cambridge, UK; dilution 1:200–500 ng/mL), and GRP 78 (Abcam-ab21685, Cambridge, UK; dilution 1:500–200 ng/mL) prepared in blocking buffer (PBS containing 1% BSA) overnight at 4°C . The primary antibody was removed, and the cells were washed 3 times with PBS. Secondary antibody and DAPI prepared in blocking buffer were added to the cells, which were incubated in the dark for 1 h at room temperature. The cells were washed with PBS, and the coverslips were mounted on slides that were examined under a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti2 with a C2si confocal system, Tokyo, Japan).

4.10. Intracellular Uptake of Curcumin-Enriched rHDLs

The cells were seeded in a 6-well plate at a density of 2×10^5 for 24 h. The culture medium was removed, and cells were washed with PBS, incubated with rHDL (H), curcumin (C), and curcumin-enriched rHDLs (Cur-rHDLs) for 3 and 6 h. The medium was removed, and the cells were washed with 500 μL of PBS and then with 500 μL of 0.4% PBS-BSA/well to remove traces of polyphenols from the cell membrane. Then, 500 μL of methanol containing 200 mM HCl/well was added to collect the intracellular polyphenol moiety by cell scraping and transfer of the medium into Eppendorf tubes. After 45 min at 4°C , the tubes were centrifuged at $14,000 \times g$ at 4°C for 5 min, and the supernatant was collected for subsequent analysis by LC-MS/MS. For quantitation, chromatographic conditions and mass spectrometer parameters were the same as described above. A calibration curve ranging from 1.953 nM to 1000 nM was used. A quality control sample was analyzed within each batch, with two blank samples containing 20% ACN in water and 0.1% formic acid.

4.11. Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test using Graph-Pad Prism 6 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was considered for a p -value < 0.05 .

5. Conclusions

We demonstrated for the first time an improved protective effect of curcumin-enriched rHDL nanoparticles on MGO-induced cerebral endothelial dysfunction linked to oxidative stress and endoplasmic reticulum stress mechanisms, that need to be further investigated in vivo. These cur-rHDL nanoparticles are stable and biocompatible and have therapeutic potential as an emerging drug delivery system for pathologies involving endothelial dysfunction and oxidative stress, such as stroke under diabetic conditions.

Author Contributions: Conceptualization, O.M., P.R. (Palaniyandi Ramanan) and M.-P.G.; methodology, P.R. (Philippe Rondeau), B.V. and P.R. (Palaniyandi Ramanan); validation, O.M.; investigation, S.S.N., S.R. and W.V.; data curation, S.S.N., S.R., P.R. (Philippe Rondeau), J.P., B.V., M.-P.G., N.D. and O.M.; writing—original draft preparation, S.S.N. and O.M.; writing—review and editing, P.R. (Philippe Rondeau), N.D., C.L.d.H. and O.M.; supervision, P.R. (Palaniyandi Ramanan), C.L.d.H. and O.M.; funding acquisition, O.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université de La Réunion, the "Structure fédérative de recherche biosécurité en milieu tropical (BIOST)" and by the European Regional Development Funds RE0001897 (EU- Région Réunion -French State national counterpart). SSN is recipient of a fellowship grant from Région Réunion.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- McLellan, A.C.; Thornalley, P.J.; Benn, J.; Sonksen, P.H. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci.* **1994**, *87*, 21–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Van Eupen, M.G.A.; Schram, M.T.; Colhoun, H.M.; Hanssen, N.M.J.; Niessen, H.W.M.; Tarnow, L.; Parving, H.H.; Rossing, P.; Stehouwer, C.D.A.; Schalkwijk, C.G. The methylglyoxal-derived AGE tetrahydropyrimidine is increased in plasma of individuals with type 1 diabetes mellitus and in atherosclerotic lesions and is associated with sVCAM-1. *Diabetologia* **2013**, *56*, 1845–1855. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kilhovd, B.K.; Giardino, I.; Torjesen, P.; Birkeland, K.; Berg, T.; Thornalley, P.; Brownlee, M.; Hanssen, K. Increased serum levels of the specific AGE-compound methylglyoxal-derived hydroimidazolone in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* **2003**, *52*, 163–167. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hanssen, N.M.J.; Westerink, J.; Scheijen, J.L.; van der Graaf, Y.; Stehouwer, C.D.; Schalkwijk, C.G.; Algra, A.; Grobbee, R.D.; Rutten, G.E.; Visseren, F.L.; et al. Higher Plasma Methylglyoxal Levels Are Associated With Incident Cardiovascular Disease and Mortality in Individuals with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 1689–1695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bourajaj, M.; Stehouwer, C.; Van Hinsbergh, V.; Schalkwijk, C. Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, *31*, 1400–1402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Yamawaki, H.; Saito, K.; Okada, M.; Hara, Y. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via JNK and p38 in human endothelial cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2008**, *295*, 1510–1517. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, W.; Chen, Z.; Yan, M.; He, P.; Chen, Z.; Dai, H. The protective role of isorhamnetin on human brain microvascular endothelial cells from cytotoxicity induced by methylglyoxal and oxygen-glucose deprivation. *J. Neurochem.* **2016**, *136*, 651–659. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Navarro, V. The Arguments against a National Health Program: Science or Ideology? *Int. J. Heal. Serv.* **1988**, *18*, 179–189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Santini, S.J.; Cordone, V.; Mijit, M.; Bignotti, V.; Aimola, P.; Dolo, V.; Falone, S.; Amicarelli, F. SIRT1-Dependent Upregulation of Antiglycative Defense in HUVECs Is Essential for Resveratrol Protection against High Glucose Stress. *Antioxidants* **2019**, *8*, 346. [\[CrossRef\]](#)
- Tang, D.; Xiao, W.; Gu, W.-T.; Zhang, Z.-T.; Xu, S.-H.; Chen, Z.-Q.; Xu, Y.-H.; Zhang, L.-Y.; Wang, S.-M.; Nie, H. Pterostilbene prevents methylglyoxal-induced cytotoxicity in endothelial cells by regulating glyoxalase, oxidative stress and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *153*, 112244. [\[CrossRef\]](#)
- Hsuuw, Y.D.; Chang, C.-K.; Chan, W.-H.; Yu, J.-S. Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *J. Cell. Physiol.* **2005**, *205*, 379–386. [\[CrossRef\]](#)
- Chan, W.H.; Wu, H.J.; Hsuuw, Y.D. Curcumin Inhibits ROS Formation and Apoptosis in Methylglyoxal-Treated Human Hepatoma G2 Cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **2005**, *1042*, 372–378. [\[CrossRef\]](#)
- Tran-Dinh, A.; Levoe, A.; Couret, D.; Galle-Treger, L.; Moreau, M.; Delbosc, S.; Hoteit, C.; Montravers, P.; Amarenco, P.; Huby, T.; et al. High-Density Lipoprotein Therapy in Stroke: Evaluation of Endothelial SR-BI-Dependent Neuroprotective Effects. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 106. [\[CrossRef\]](#)
- Tran-Dinh, A.; Diallo, D.; Delbosc, S.; Varela-Perez, L.M.; Dang, Q.B.; Lapergue, B.; Burillo, E.; Michel, J.B.; Levoe, A.; Martin-Ventura, J.L.; et al. HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 493–511. [\[CrossRef\]](#)
- Gonzales, C.M.; Dalmolin, L.F.; da Silva, K.A.; Slade, N.B.L.; Lopez, R.F.V.; Moreto, J.A.; Schwarz, K. New Insights of Turmeric Extract-Loaded PLGA Nanoparticles: Development, Characterization and In Vitro Evaluation of Antioxidant Activity. *Mater. Veg.* **2021**, *76*, 507–515. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, D.; Kim, K.-A.; Kim, J.-H.; Kim, E.-H.; Bae, O.-N. Methylglyoxal-Induced Dysfunction in Brain Endothelial Cells via the Suppression of Akt/HIF-1 α Pathway and Activation of Mitophagy Associated with Increased Reactive Oxygen Species. *Antioxidants* **2020**, *9*, 820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Koike, S.; Toriumi, K.; Kasahara, S.; Kibune, Y.; Ishida, Y.-I.; Dan, T.; Miyata, T.; Arai, M.; Ogasawara, Y. Accumulation of Carbonyl Proteins in the Brain of Mouse Model for Methylglyoxal Detoxification Deficits. *Antioxidants* **2021**, *10*, 574. [\[CrossRef\]](#)
- Rabbani, N.; Thornalley, P.J. Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 309–317. [\[CrossRef\]](#)
- Kim, J.H.; Kim, K.A.; Shin, Y.J.; Kim, H.; Majid, A.; Bae, O.N. Methylglyoxal induced advanced glycation end products (AGE)/receptor for AGE (RAGE)-mediated angiogenic impairment in bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* **2018**, *81*, 266–277. [\[CrossRef\]](#)
- Vulesevic, B.; McNeill, B.; Giacco, F.; Maeda, K.; Blackburn, N.J.R.; Brownlee, M.; Milne, R.W.; Suuronen, E.J. Methylglyoxal-Induced Endothelial Cell Loss and Inflammation Contribute to the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes* **2016**, *65*, 1699–1713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chan, W.H.; Wu, H.J. Methylglyoxal and high glucose co-treatment induces apoptosis or necrosis in human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *103*, 1144–1157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

22. Choudhary, D.; Chandra, D.; Kale, R.K. Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicol. Lett.* **1997**, *93*, 141–152. [[CrossRef](#)]
23. Weber, V.; Olzscha, H.; Längrich, T.; Hartmann, C.; Jung, M.; Hofmann, B.; Horstkorte, R.; Bork, K. Glycation Increases the Risk of Microbial Traversal through an Endothelial Model of the Human Blood-Brain Barrier after Use of Anesthetics. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 3672. [[CrossRef](#)]
24. Miyazawa, N.; Abe, M.; Souma, T.; Tanemoto, M.; Abe, T.; Nakayama, M.; Ito, S. Methylglyoxal augments intracellular oxidative stress in human aortic endothelial cells. *Free Radic. Res.* **2009**, *44*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Li, W.; Maloney, R.E.; Circu, M.L.; Alexander, J.S.; Aw, T.Y. Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *54*, 51–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zannis, V.I.; Fotakis, P.; Koukos, G.; Kardassis, D.; Ehnholm, C.; Jauhiainen, M.; Chroni, A. HDL Biogenesis, Remodeling, and Catabolism. *Anxiety Anxiolytic Drugs* **2014**, *224*, 53–111.
27. Kim, S.; Kim, S.; Hwang, A.R.; Choi, H.C.; Lee, J.Y.; Woo, C.H. Apelin-13 inhibits methylglyoxal-induced unfolded protein responses and endothelial dysfunction via regulating AMPK pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Chan, C.M.; Huang, D.-Y.; Huang, Y.-P.; Hsu, S.-H.; Kang, L.-Y.; Shen, C.-M.; Lin, W.W. Methylglyoxal induces cell death through endoplasmic reticulum stress-associated ROS production and mitochondrial dysfunction. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 1749–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Liebner, S.; Plate, K.H. Differentiation of the brain vasculature: The answer came blowing by the Wnt. *J. Angiogenesis Res.* **2010**, *2*, 1. [[CrossRef](#)]
30. Japp, A.G.; Newby, D.E. The apelin–APJ system in heart failure: Pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1882–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Yang, X.; Zhu, W.; Zhang, P.; Chen, K.; Zhao, L.; Li, J.; Wei, M.; Liu, M. Apelin-13 stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in myocardial microvascular endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* **2014**, *9*, 1590–1596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jutooru, I.; Chadalapaka, G.; Lei, P.; Safe, S. Inhibition of NFκB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 25332–25344. [[CrossRef](#)]
33. Chhunchha, B.; Fatma, N.; Kubo, E.; Rai, P.; Singh, S.P.; Singh, D.P. Curcumin abates hypoxia-induced oxidative stress based-ER stress-mediated cell death in mouse hippocampal cells (HT22) by controlling Prdx6 and NF-κB regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2013**, *304*, 636–655. [[CrossRef](#)]
34. Holder, G.M.; Plummer, J.L.; Ryan, A.J. The Metabolism and Excretion of Curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the Rat. *Xenobiotica* **1978**, *8*, 761–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pan, M.H.; Huang, T.M.; Lin, J.K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 486–494.
36. Júnior, O.V.R.; Alves, B.D.S.; Barros, P.A.B.; Rodrigues, J.L.; Ferreira, S.P.; Monteiro, L.K.S.; Araújo, G.D.M.S.; Fernandes, S.S.; Vaz, G.R.; Dora, C.L.; et al. Nanoemulsion Improves the Neuroprotective Effects of Curcumin in an Experimental Model of Parkinson’s Disease. *Neurotox. Res.* **2021**, *39*, 787–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Singh, A.; Mahajan, S.D.; Kutscher, H.L.; Kim, S.; Prasad, P.N. Curcumin-Pluronic Nanoparticles: A Theranostic Nanoformulation for Alzheimer’s Disease. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2020**, *48*, 153–168. [[CrossRef](#)]
38. Jutkova, A.; Chorvat, D.; Miskovsky, P.; Jancura, D.; Datta, S. Encapsulation of anticancer drug curcumin and co-loading with photosensitizer hypericin into lipoproteins investigated by fluorescence resonance energy transfer. *Int. J. Pharm.* **2019**, *564*, 369–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Paternò, R.; Ruocco, A.; Postiglione, A.; Hubsch, A.; Andresen, I.; Lang, M.G. Reconstituted High-Density Lipoprotein Exhibits Neuroprotection in Two Rat Models of Stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **2003**, *17*, 204–211. [[CrossRef](#)]
40. Sulliman, N.C.; Ghaddar, B.; Gence, L.; Patche, J.; Rastegar, S.; Meilhac, O.; Diotel, N. HDL biodistribution and brain receptors in zebrafish, using HDLs as vectors for targeting endothelial cells and neural progenitors. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Couret, D.; Planesse, C.; Patche, J.; Diotel, N.; Nativel, B.; Bourane, S.; Meilhac, O. Lack of Neuroprotective Effects of High-Density Lipoprotein Therapy in Stroke under Acute Hyperglycemic Conditions. *Molecules* **2021**, *26*, 6365. [[CrossRef](#)]
42. Hatia, S.; Septembre-Malaterre, A.; Le Sage, F.; Badiou-Bénéteau, A.; Baret, P.; Payet, B.; D’Hellencourt, C.L.; Gonthier, M.-P. Evaluation of antioxidant properties of major dietary polyphenols and their protective effect on 3T3-L1 preadipocytes and red blood cells exposed to oxidative stress. *Free Radic. Res.* **2014**, *48*, 387–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Advanced glycation end-products disrupt brain microvascular endothelial cell barrier: The role of mitochondria and oxidative stress

Anthony Dobi^{a,b}, Sarah Rosanaly^{a,b}, Anne Devin^c, Pascal Baret^{a,b}, Olivier Meilhac^{a,b,d}, G. Jean Harry^e, Christian Lefebvre d'Hellencourt^{a,b,e,*}, Philippe Rondeau^{a,b,*}

^a Inserm, UMR 1188 Diabète Athéromatose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROD), plateforme CYROI, 97490 Sainte-Clotilde, France

^b Université de La Réunion, UMR 1188, 97490 Sainte-Clotilde, France

^c CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, Université de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

^d CHU de La Réunion, Centre d'Investigation Clinique, 97400 Saint-Denis, France

^e Neurotoxicology Group, National Toxicology Program Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, 27709 Research Triangle Park, NC, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes
Advanced glycation end-products
Oxidative stress
Endothelial dysfunction
Mitochondria

ABSTRACT

During diabetes mellitus, advanced glycation end-products (AGEs) are major contributors to the development of alterations in cerebral capillaries, leading to the disruption of the blood-brain barrier (BBB). Consequently, this is often associated with an amplified oxidative stress response in microvascular endothelial cells. As a model to mimic brain microvasculature, the bEnd.3 endothelial cell line was used to investigate cell barrier function. Cells were exposed to native bovine serum albumin (BSA) or modified BSA (BSA-AGEs). In the presence or absence of the antioxidant compound, N-acetyl-cysteine, cell permeability was assessed by FITC-dextran exclusion, intracellular free radical formation was monitored with H₂DCF-DA probe, and mitochondrial respiratory and redox parameters were analyzed. We report that, in the absence of alterations in cell viability, BSA-AGEs contribute to an increase in endothelial cell barrier permeability and a marked and prolonged oxidative stress response. Decreased mitochondrial oxygen consumption was associated with these alterations and may contribute to reactive oxygen species production. These results suggest the need for further research to explore therapeutic interventions to restore mitochondrial functionality in microvascular endothelial cells to improve brain homeostasis in pathological complications associated with glycation.

1. Introduction

Cerebral homeostasis is dependent on the integrity of the blood-brain barrier (BBB), a highly specialized vascular interface separating the blood compartment from the brain parenchyma. Brain microvascular endothelial cells play a key role in maintaining BBB cohesion through the expression of tight junction proteins (Luissint et al., 2012). In type 2 diabetes mellitus (T2DM), the BBB is altered by the associated chronic hyperglycemia and the advanced glycation end-products (AGEs) formed as a result of non-enzymatic glycation and oxidation reactions (Prasad et al., 2014; Shahriyari et al., 2018). AGEs-associated endothelial oxidative stress represents a central element in vascular BBB lesions resulting in increased permeability and allowing for entry of potentially neurotoxic substances (Liu et al., 2017; Niiya et al., 2012). These substances can be associated with cerebral dysfunction often characterized in humans by cognitive declines, dementia, or psychiatric complications

(Huber, 2008). In many of these neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease (Kawamura et al., 2012; Saedi et al., 2016), diabetes is a comorbidity. This adds significant health concerns in that the diabetic component can compromise vascular integrity and in the case of cerebral ischemia following a stroke it can lead to hemorrhagic complications (Ergul et al., 2012; Venkat et al., 2017).

Previous investigations on BBB cell-based models have shown the involvement of AGEs-linked endothelial oxidative stress to cell barrier disruption (Freeman and Keller, 2012; Liu et al., 2017; Niiya et al., 2012). However, from these studies little is known regarding the role of mitochondria as a possible source of reactive oxygen species (ROS). There is evidence that mitochondria play a role in BBB stability (Doll et al., 2015) and mitochondrial metabolism is known to change with diabetes and neurodegeneration (Pugazhenthil et al., 2017). However, for many years mitochondria were neglected in studies on endothelial cells because of their proposed minor contribution in ATP production

* Corresponding authors at: DéTROD - Université de La Réunion - CYROI, 2, rue Maxime Rivière, BP 80 005, 97491 Sainte Clotilde Cedex, La Réunion, France.
E-mail addresses: christian.lefebvre-d-hellencourt@univ-reunion.fr (C.L. d'Hellencourt), rophil@univ-reunion.fr (P. Rondeau).

(Davidson and Duchon, 2007) even though the mitochondrial content of BBB endothelial cells is greater than that of cells present in other capillary beds (Brosnan and Claudio, 1998; Oldendorf et al., 1977). Thus, one could assume that examining alterations in mitochondrial metabolism in the endothelial cells of the BBB would significantly contribute to our understanding of physiology and pathophysiology of the brain microvasculature.

A major factor associated with chronic hyperglycemia are the AGEs. These compounds are formed with oxidative reactions and have been demonstrated to induce an oxidative stress response in endothelial cells (Dobi et al., 2019; Paradelo-Dobarro et al., 2016). One accepted *in vitro* method to assess the effects of AGEs is exposure to isolated AGEs (Patche et al., 2017). In patients with diabetes, the structure and function of the most abundant protein in plasma, albumin (35–50 g/L) (Peters, 1996), has been shown to be significantly impaired (Baraka-Vidot et al., 2015; Guerin-Dubourg et al., 2012). This protein has a 19 days half-life and shows vulnerability to glycoxidation (Rondeau and Bourdon, 2011). To examine the potential association between alterations in mitochondrial respiration and endothelial dysfunction, the murine endothelial cell line, bEnd.3 was used as an *in vitro* model for evaluating BBB function, especially the paracellular barrier (Watanabe et al., 2013). The effect of albumin AGEs was studied on cell barrier permeability, redox homeostasis and mitochondrial respiration. The findings demonstrated a relationship between these three parameters in brain microvascular endothelial cells exposed to AGEs.

2. Material and methods

2.1. Materials

Bicinchoninic acid (BCA), methylglyoxal (MGO), crystal violet, 2–4 Dinitrophenol (DNP), fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran), mannitol, *N*-acetyl-L-cysteine (NAC), HEPES, oligomycin, F1F0-ATP synthase inhibitor, rotenone, carbonyl cyanide 4-(tri-fluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), antimycin A, superoxide dismutase (SOD), 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate (DTNB), xanthine, xanthine oxidase, cytochrome c, dichlorodihydrofluorescein-diacetate (H₂DCF-DA) and 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

2.2. Preparation of AGEs

Native and modified bovine serum albumin (BSA and BSA-AGEs respectively) were prepared as previously described (Dobi et al., 2019): BSA (fatty acid-poor, endotoxin-free, Calbiochem #126579) was prepared at 40 g/L in phosphate-buffered saline (PBS; 0.2 M, pH 7.4) and incubated 9 days at 37 °C in the dark in the presence or absence of 10 mM methylglyoxal under sterile conditions and with gentle agitation. After AGEs formation, unincorporated methylglyoxal was removed by extensive dialysis against fresh PBS. Protein concentration was determined by bicinchoninic acid protein assay (BCA, Sigma) and BSA and BSA-AGEs were stored at –80 °C until time of assay. Both BSA and BSA-AGEs samples have been previously well-characterized (Dobi et al., 2019). BSA-AGEs exhibited higher levels of glycation and carbonylation and contained in particular more MG-H1, argpyrimidine and imidazole B AGE-adducts than BSA (Dobi et al., 2019).

2.3. Cell culture

The murine immortalized bEnd.3 cerebral microvascular endothelial cell line was obtained from the American Culture Collections (ATCC®-CRL-2299TM). bEnd.3 cells were maintained in high-glucose (4.5 g/L) DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FBS (56 °C, 30 min), 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. At 90–100% confluency, medium was removed and cells were equilibrated in serum-free DMEM. After 24

h, medium was removed and cells were exposed for 1 h or 24 h to either native BSA or BSA-AGEs diluted in serum-free DMEM at 50 μM or equivalent volume of PBS (control) and in presence or absence of *N*-acetyl cysteine (NAC, 0.5 mM) or 2,4-dinitrophenol (DNP, 0.25 μM to 100 μM). This pathological concentration model was well characterized and previously reported (Dobi et al., 2019; Patche et al., 2017).

2.4. Cell viability

Confluent bEnd.3 cells (100 000 cells / 96-well plate) were exposed to vehicle, BSA or BSA-AGEs for 24 h. Cells were washed with PBS followed by the addition of 50 μL 0.1% crystal violet solution for 10 min. The cells were carefully rinsed three times and 200 μL of 1% sodium dodecyl sulfate were added to each well to solubilize the dye and absorbance read at 570 nm. Individual absorbance values under each condition were calculated as the mean response of vehicle exposed cells.

2.5. Measurement of endothelial barrier permeability

Endothelial barrier permeability was assayed on endothelial bEnd.3 cells. Cells (3×10^5) were seeded on Millicell® 12-well hanging cell culture inserts (PET membrane with 0.4 μm pores). The measurement of endothelial barrier permeability was performed on confluent cells using dextran (4 kDa and 70 kDa) labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), before and after treatments with vehicle control (PBS), native BSA or modified BSA (BSA-AGEs) at 50 μM, for 24 h. Mannitol was used at the concentration of 1.4 M as a hyperosmotic solution to induce the opening of the endothelial barrier (positive control) (Ikeda et al., 2002; Rapoport, 2000). Dextran (4 kDa and 70 kDa) was prepared at 0.385 mg/mL in serum-free RPMI 1640 (without phenol red) and 800 μL of the solution were added on cells (apical chamber), after a washing step with PBS. The basolateral chamber was composed of serum-free RPMI 1640 (without dextran at the beginning of the test). 10 min after the addition of dextran in the apical chamber, the inserts were placed in another well containing fresh RPMI (without dextran) for an additional 10 min. The inserts were then removed and aliquots of RPMI that was in the basolateral chamber were used to measure the intensity of fluorescence of FITC (reflecting the quantity of dextran that crossed the endothelial barrier). The excitation/emission wavelength was set at 485/520 nm for FITC fluorescence (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Results were expressed as variation of FD4 or FD70 quantities (μg) corresponding to the difference of FITC-dextran quantity measured after and before cells' stimulation.

2.6. Measurement of reactive oxygen species

Cells were plated in 96-well plate (0.1×10^6 cells/well), allowed to acclimate for 24 h followed by exposure to vehicle, BSA or BSA-AGEs for 1 or 24 h and also to DNP (0.25 μM to 100 μM). Cells were washed with PBS then incubated at 37 °C (in 5% CO₂ incubator) for 30 min with 10 μM H₂DCF-DA in serum-free DMEM. Cells were washed with PBS and fluorescence intensity (485/520 nm) was measured by the FLUOstar Omega (BMG Labtech) using a well-scanning mode (4×4).

2.7. Cellular oxygen consumption rate

2.7.1. Oroboros

Endothelial bEnd.3 cells were cultured in T25 flasks. After treatment (BSA or BSA-AGEs in presence or absence of *N*-acetyl cysteine), they were washed with PBS, collected with trypsin/EDTA and centrifuged at 400 g for 5 min, at room temperature. Subsequently, cell pellets were suspended in 500 μL serum-free high-glucose DMEM and divided in two new cellular suspensions containing about 2×10^6 cells. Basal oxygen consumption rates (OCR) were continuously measured on whole cells at 37 °C, using a Clark-type oxygen electrode (Oroboros Oxygraph-2 k, Oroboros Instruments). The respiration medium consisted of serum-free

DMEM buffered with 10 mM HEPES in a final volume of 2.1 mL. For calibration of the polarographic oxygen sensor and measurement of background oxygen consumption, the respiration medium without biological sample was added into the O2k-Chamber. For each experimental condition, OCR was measured in the presence or absence of the F1F0-ATP synthase inhibitor, oligomycin (0.1 μ M), the protonophoric uncoupler, dinitrophenol (300–400 μ M) and the inhibitor of mitochondrial complex III, antimycin A (0.1 μ M). OCR values specifically related to mitochondria were calculated by subtracting non-mitochondrial respiration (in the presence of antimycin A). Data were expressed as picomoles O₂ consumed by cells per second and per milligram of cell protein determined by BCA.

2.7.2. Seahorse bioanalyzer

Cells were expanded in tissue culture flasks, trypsinized, and replated for analysis. XF24 24-well Seahorse plates were seeded with bEnd.3 cells at a density of 25 000 cells/well and allowed to acclimate for 24 h under normal incubation conditions. The medium was changed to DMEM without FCS and the cells were exposed to BSA or BSA-AGEs for 18 h under normal incubation conditions. The medium was then changed to Seahorse assay medium and the cells were incubated at 37 °C in a CO₂-free atmosphere for 1 h prior to assay. Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were detected in quintuplicate across 3 readings in presence of sequential additions of oligomycin (1 μ M), FCCP (2.5 μ M), and rotenone (3 μ M). For normalization, at the end of the measurement, cell lysate protein concentrations were determined by BCA protein assay as previously described (Dranka et al., 2011).

2.8. Protein isolation from bEnd.3 cells and enzymatic assays

Following exposure, bEnd.3 cells were washed with PBS, scraped from the plate, centrifuged (2 000 rpm for 5 min), and the cell pellet was resuspended in a lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, Triton 0.1%, pH 7.4). The lysis was subjected to five cycles of fast freezing in liquid nitrogen followed by thawing in a 37 °C water bath. Then, the lysates samples were stored at –80 °C until assay.

To determine citrate synthase activity, a 10 μ L aliquot (at about 0.5 μ g/ μ L of protein) of the lysate was combined with 180 μ L reaction mixture (50 mM Tris buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.1 mM acetyl-CoA, 0.2 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 0.5 mM oxaloacetate). This allows for a reaction with citrate synthase in the lysate. The reaction product was detected in a plate reader at 412 nm for 3 min, at 37 °C. Enzyme activity was calculated using a molar extinction coefficient of 13,600 M^{–1} cm^{–1} at 412 nm. Results were expressed as nanomoles of DTNB reduced/min/mg protein calculated as a percent of vehicle control.

Manganese-dependent superoxide dismutase (Mn-SOD or SOD2) activity was determined using the cytochrome *c* reduction assay. In this method, superoxide radicals generated by the xanthine/xanthine oxidase system reduce cytochrome *c*, thereby leading to an increase in absorbance at 560 nm. 20 μ L aliquot (about 20 μ g of protein) of the lysates was combined with 170 μ L reaction mixture (xanthine oxidase, xanthine (0.5 mM), cytochrome *c* (0.2 mM), KH₂PO₄ (50 mM, pH 7.8), EDTA (2 mM) and NaCN (1 mM)). The reaction was monitored in a microplate reader at 560 nm for 1 min, at 25 °C. Mn-SOD activity was calculated using a calibration standard curve of SOD (up to 6 units/mg) from the slope of the linear portion of the absorbance. Results were expressed as international catalytic units per milligram of cell protein and then normalized in percentage *versus* the vehicle control condition.

2.9. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD from at least three independent experiments conducted in duplicate or triplicate. Statistical significance was determined using Student *t*-test for two groups comparisons or a

one-way or two way ANOVA followed by Tukey's test for comparisons of multiple times or conditions (Graph Pad Prism). Detection of outliers and variance homogeneity (Kolmogorov-Smirnov) was performed prior to statistical analysis. Statistical significance was set at *p* < 0.05.

3. Results

3.1. BSA-AGEs induce an increase in bEnd.3 cells permeability

Before investigating the impact of methylglyoxal-modified bovine serum albumin (BSA-AGEs) on bEnd.3 cell barrier permeability (*i.e.* on a physiological parameter) we checked its potential toxicity in our experimental condition. The crystal violet assay showed that BSA-AGEs did not affect significantly cell viability of bEnd.3 cells (Fig. 1A) and therefore could be used for a cell exposition of at least 24 h. The endothelial permeability was investigated by using an intermediate (4 kDa) and a large-size (70 kDa) fluorescent tracer (FITC-dextran).

Mannitol at 1.4 M (osmotic regulator) was used as positive control to induce an osmotic opening of endothelial barrier. The marked increase in FD4 or FD70 in the basolateral chamber for cells exposed to mannitol, after 20 min of dextran exposition, allowed us to show the validity of the assay and the robustness of cell response (Fig. 1B–C). After treatment with BSA-AGEs followed by dextran exposition, a greater quantity of FD4 in the basolateral chamber was measured, as compared to native BSA treatments (Fig. 1B: + 55% and + 210% after 10 min and 20 min exposition, respectively, *p* < 0.01). The increase of the large-size tracer FD70 observed in the basolateral compartment of cells treated with BSA-AGEs after 10 min or 20 min of dextran exposition did not reach statistical significance (Fig. 1C). It should also be noted that 24 h treatment with BSA alone does not affect the monolayer permeability (data not shown). These data suggest that endothelial barrier permeability is increased upon BSA-AGEs treatment.

BSA-AGEs induce intracellular bEnd.3 oxidative stress with increase in SOD2 activity.

As oxidative stress is well characterized to be involved in endothelial cell barrier disruption (Freeman and Keller, 2012), we monitored intracellular ROS formation with H₂DCF-DA fluorescent probe that mainly detects hydrogen peroxide (H₂O₂) (Fig. 2/ Fig. S1). Significant enhancements in ROS production were observed in bEnd.3 cells treated in the presence of BSA-AGEs for a short-term exposure (1 h) (+ 47%, *p* < 0.01 vs. BSA) and also for a long term exposure (24 h) (+ 56%, *p* < 0.001 vs. BSA) (Fig. 2A). In light of these results, confluent bEnd.3 cells were thus subjected to a marked and prolonged oxidative stress in the presence of BSA-AGEs. In the presence of NAC (0.5 mM), an antioxidant compound known to react with H₂O₂ and H₂O₂-derived ROS, ROS production was significantly reduced for BSA-treated cells (– 44%, *p* < 0.05 vs. BSA), as well as for BSA-AGEs-treated cells (– 25%, *p* < 0.05 vs. BSA-AGEs) (Fig. 2B) as attested by the decrease in DCF fluorescence.

To confirm the link between cell barrier permeability and oxidative stress in our model, we next performed FD4 assay in the presence of NAC. The antioxidant significantly decreased endothelial barrier permeability for BSA-AGEs treated cells (– 45%, *p* < 0.05 vs. BSA-AGEs) (Fig. 2C). These results demonstrate that BSA-AGEs-induced increase in endothelial barrier permeability is due, at least in part, to oxidative stress, and not to an alteration in cell viability.

Given that mitochondria could be involved in oxidative stress, SOD2 activity was assessed in bEnd.3 cells. This protein is a key antioxidant enzyme in mitochondrial matrix, modulating ROS formation in these organelles (Storz et al., 2005). In our experimental condition (after 24 h treatment), a significant increase in SOD2 activity was evidenced between BSA and BSA-AGEs conditions (+38%, *p* < 0.05 vs. BSA) (Fig. 2D).

3.2. BSA-AGEs impaired bEnd.3 mitochondrial metabolism

To further investigate the mitochondrial aspect related to oxidative stress, we studied the respiratory metabolism of bEnd.3 cells using two

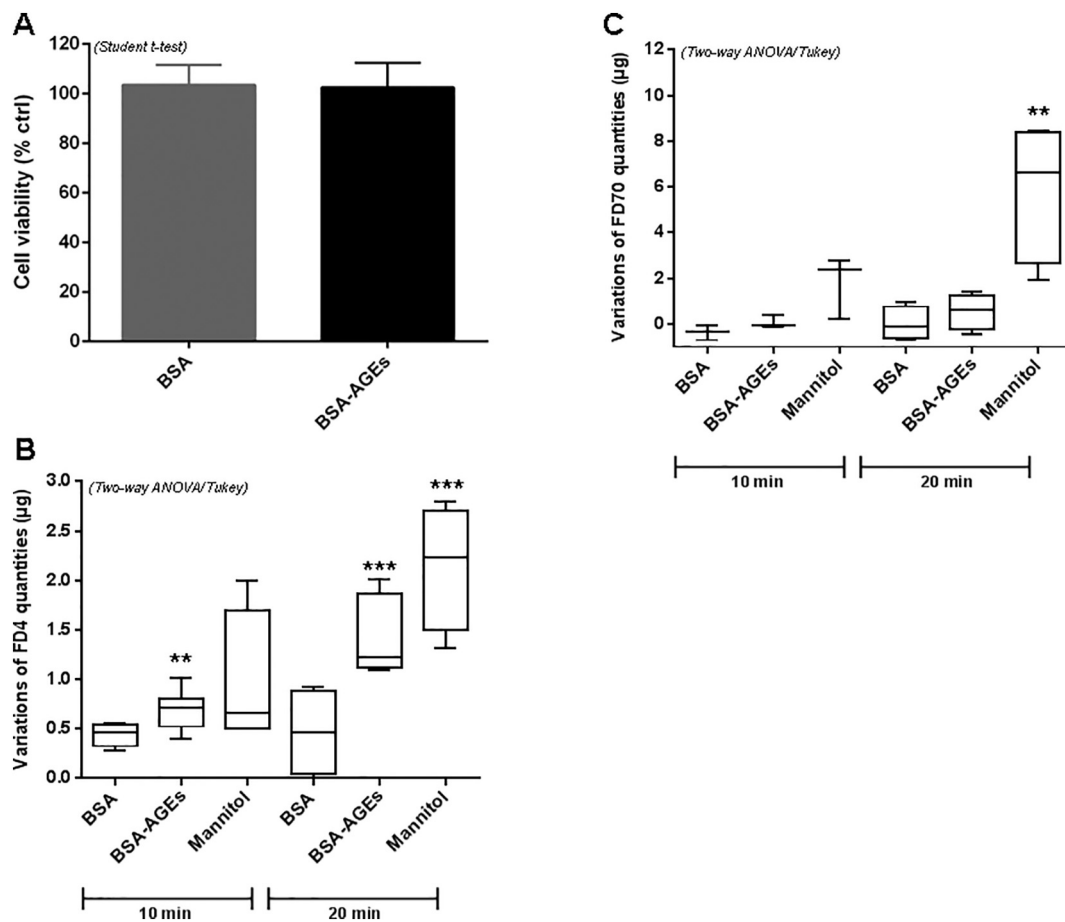


Fig. 1. BSA-AGEs increase endothelial barrier permeability.

A) Cell viability was determined by crystal violet cell adherence assay after treatments with BSA or BSA-AGEs at 50 µM for 24 h. Bars represent the mean ± SD cell number in each condition as a percentage of control ($n = 4$).

Permeability was assayed on bEnd.3 cells using **B)** 4 kDa FITC-dextran (FD4) and **B)** 70 kDa FITC-dextran (FD70) before and after treatments with BSA or BSA-AGEs at 50 µM for 24 h. Mannitol diluted in DMEM (1.4 M) was used as positive control. The intensity of FITC fluorescence was measured in each basolateral chamber 10 min and 20 min after the addition of FD4 or FD70 in the apical chamber. Bars represent the mean ± SD of the variations of dextran quantities (µg) having crossed cell barrier ($n = 4-5$). *Effect of BSA-AGEs or Mannitol (vs. BSA) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ determined by Tukey's *post hoc* analysis following a significant two way ANOVA (for B and C). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

different methods of analysis: the Oxygraph-2 k high-resolution respirometer and the high-throughput Seahorse Extracellular Flux (XF) Analyzer.

The different type of mitochondrial respiration (oxygen consumption) (spontaneous, state 4 and maximal respirations) investigated with Oroboros are shown in Fig. 3A-C. Basal mitochondrial (phosphorylating state) and maximal (with DNP) respirations were found to be significantly reduced after BSA-AGEs stimulation (-18% , $p < 0.05$ vs. BSA) (Fig. 3A) and (-15% , $p < 0.05$ vs. BSA) (Fig. 3C), respectively. Regarding state 4 respiration (non phosphorylating state in the presence of oligomycin), no difference was recorded between BSA and BSA-AGEs conditions (Fig. 3B). Similar results were obtained with the Seahorse analyzer (Fig. 3D-F). Indeed, a quite equivalent reduction in basal respiration was observed (-26% , $p < 0.05$ vs. BSA) (Fig. 3D) and in maximal respiration (-38% , $p < 0.05$ vs. BSA) (Fig. 3F) for BSA-AGEs treated cells in comparison BSA condition. However, the decrease in the state 4 respiration between BSA and BSA-AGEs conditions (-15% vs. BSA) failed to reach statistical significance (Fig. 3E). Taken together, our data reveal that, using either the Oroboros or the Seahorse, an alteration of mitochondrial respiration is evidenced in BSA-AGEs condition, as compared to native BSA condition.

To confirm the involvement of mitochondria in BSA-AGEs-enhanced oxidative stress, we co-incubated cells with different concentrations of

dinitrophenol (DNP). In our experimental conditions, DNP is applied to bEnd.3 cells only for 45 min and at low concentrations (0.25 to 100 µM) as compared to the maximal (and potentially toxic) concentration that is required to achieve maximal mitochondrial respiration (about 400 µM). In this condition, DNP did not exert significant changes in cell viability (see Fig. S2). Indeed, low doses of artificial uncoupler have been demonstrated to decrease mitochondrial superoxide formation by dissipating the electrochemical potential gradient, thereby accelerating the rate of electron transfer (Kariman et al., 1986). As expected, DCF fluorescence was modulated by DNP. It was decreased at low concentrations of the compound, particularly at 0.25 µM (-17% , $p < 0.05$ vs. control cells without DNP), and amplified at higher concentrations, particularly at 100 µM ($+16\%$, $p < 0.05$) (Fig. 4A). This mitochondrial uncoupler, used at 0.25 µM, did not have any significant effect in DCF fluorescence for native BSA- treated cells and induce a marked decrease in ROS production for BSA-AGEs- treated cells (-23% , $p < 0.05$ vs. BSA-AGEs) (Fig. 4B). These results suggest a specific role of mitochondria in ROS production during BSA-AGEs treatment.

3.3. NAC recovered altered mitochondrial respiration of bEnd.3 cells upon BSA-AGEs stimulation

As mitochondria contribute to oxidative stress in BSA-AGEs-treated

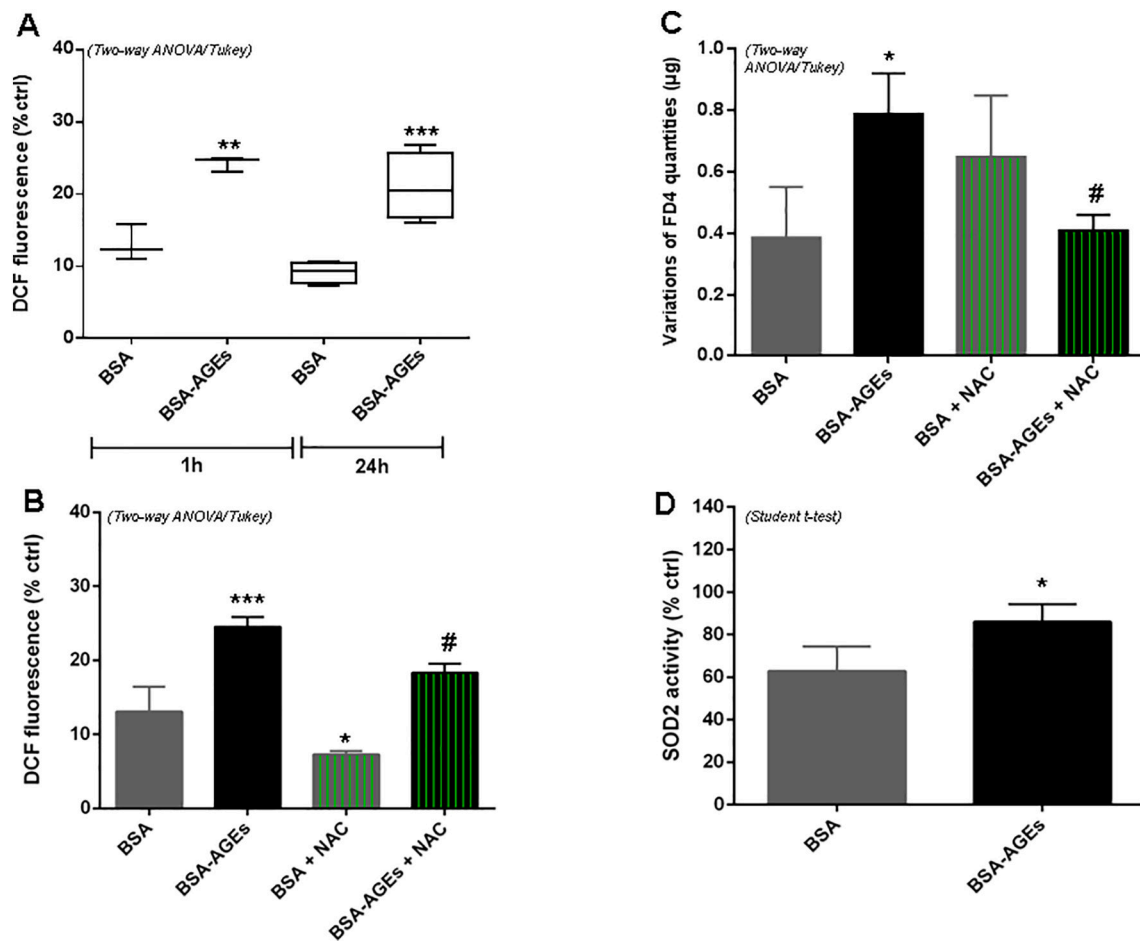


Fig. 2. BSA-AGEs induce an increase in bEnd.3 oxidative stress associated with endothelial barrier permeability which could be partially reduced by *N*-acetyl cysteine.

ROS levels were determined with H_2DCF -DA probe in bEnd.3 cells treated with BSA or BSA-AGEs at 50 μ M **A**) for 1 h or 24 h, and **B**) for 1 h in the presence or absence of 0.5 mM *N*-acetyl cysteine (NAC). Bars represent the mean $\pm$ SD of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) fluorescence as a percentage of vehicle ($n = 3-4$). **C**) Permeability was assayed on bEnd.3 cells using 4 kDa FITC-Dextran (FD4) before and after treatments with BSA or BSA-AGEs (50 μ M) for 24 h, in the presence or absence of 0.5 mM NAC. The intensity of fluorescence from FITC was measured in each basolateral chamber 10 min after the addition of FD4 in the apical chamber. Bars represent the mean $\pm$ SD of the variations of dextran quantities having crossed cell barrier ($n = 4-5$). **D**) SOD2 activity was determined in lysates from cells previously treated with BSA or BSA-AGEs (50 mM) for 24 h. Bars represent the mean $\pm$ SD of the enzyme activity (expressed as % of international catalytic unit in regard to vehicle condition ($n = 3$)).

*Effect of BSA-AGEs (vs. BSA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. #Effect of NAC (vs. BSA-AGEs). # $p < 0.05$ determined by Tukey's *post hoc* analysis following a significant two way ANOVA (for A, B and C) or by a Student *t*-test (for D).

bEnd.3 cells, we sought to determine the cause of the decreased oxygen consumption in these conditions. We hypothesized that oxidative stress itself could be responsible for this phenomenon. To confirm this hypothesis, mitochondrial respiration was assessed using the Oroboros method on bEnd.3 cells treated with BSA or BSA-AGEs and in the presence of NAC (0.5 mM). NAC did not change significantly spontaneous mitochondrial respiration in BSA condition. In cells co-incubated with BSA-AGEs and NAC, this basal respiratory state was found to be markedly enhanced in comparison with cells only stimulated with BSA-AGEs (+16%, $p < 0.05$ vs. BSA-AGEs) (Fig. 5A). Thus, the reduction of this parameter initially recorded between BSA and BSA-AGEs conditions was attenuated by an antioxidant treatment. The effect of NAC on state 4 respiration was less obvious, as long as the increase in oxygen consumption in the condition BSA-AGEs + NAC, as compared to the condition BSA-AGEs (+4%) did not reach statistical significance (Fig. 5B). The tendency of BSA-AGEs to lessen the proton leak relative to native BSA was inhibited by NAC. No major impact of NAC on maximal respiration was observed. However, the significant decrease initially detected after BSA-AGEs stimulation (−15%, $p < 0.05$ vs. BSA) was no longer observed for cells upon co-exposure to NAC (*i.e.* no difference in

oxygen consumption between the conditions BSA + NAC and BSA-AGEs + NAC) (Fig. 5C). Given that no variation of citrate synthase activity (a well-accepted indicator of cell mitochondrial content (Baret et al., 2018; Larsen et al., 2012)) as evidenced between the different conditions (Fig. 5D), our findings confirm the role of oxidative stress in the alteration of mitochondrial respiratory parameters of bEnd.3 cells.

Not surprisingly, we found a modulation of SOD2 activity when bEnd.3 cells were co-incubated with BSA-AGEs and NAC. Indeed, the significant increase in SOD2 activity shown for BSA-AGEs treated cells (+38%, $p < 0.05$ vs. BSA), was found to be completely lost in presence of NAC (−40%, $p < 0.05$ vs. BSA-AGEs) (Fig. 5E). These last results are in accordance with the capacity of NAC to recover the altered mitochondrial respiration during BSA-AGEs stimulation.

4. Discussion

Thanks to an *in vitro* model of brain microvasculature (bEnd.3 cells) we demonstrated the involvement of mitochondria in oxidative stress induced with BSA-AGEs exposure. This involvement was evidenced by the conjunction of two phenomena: enhancement of SOD2 activity

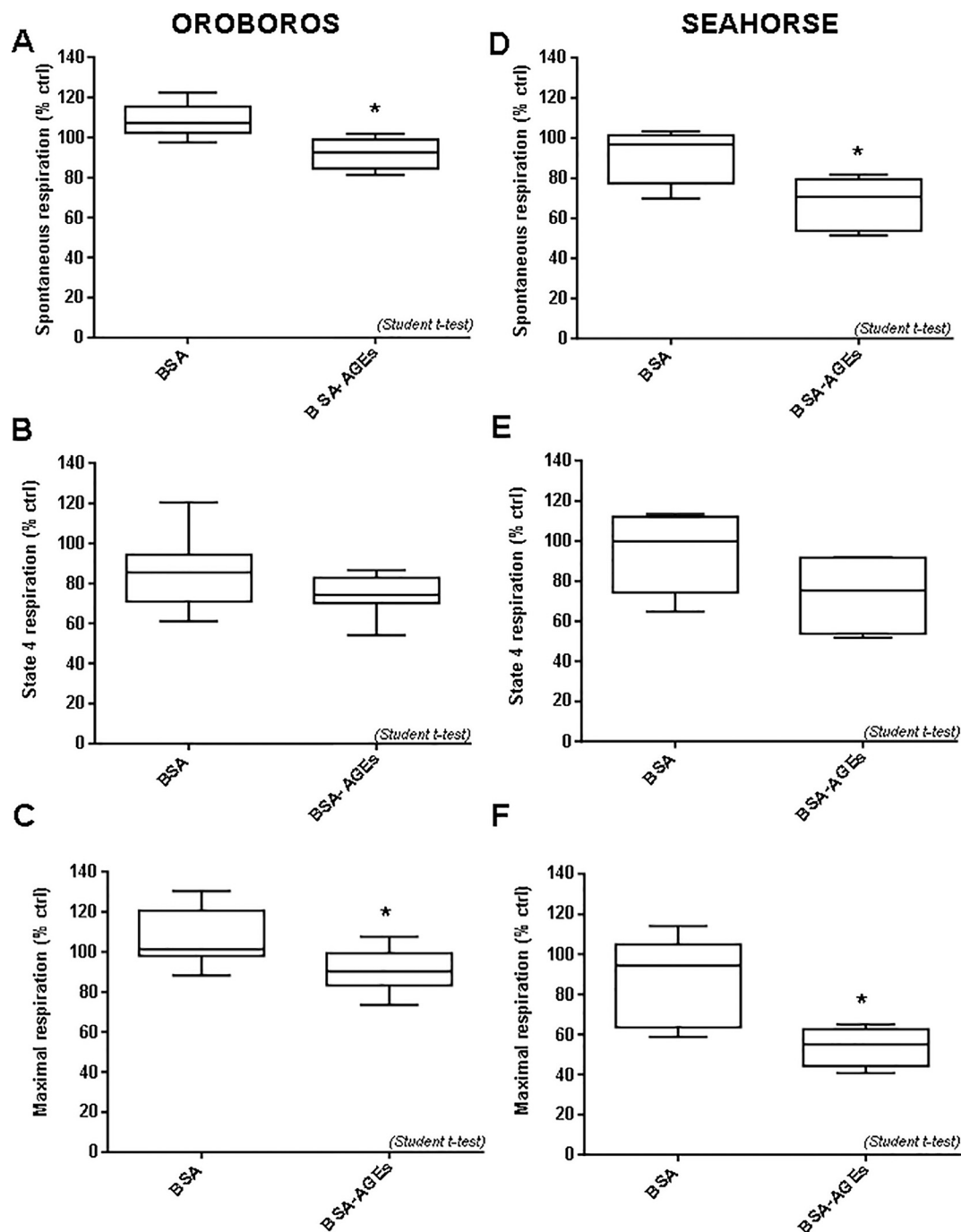


Fig. 3. BSA-AGEs alter mitochondrial respiratory parameters of bEnd.3 cells.

Oxygen consumption by bEnd.3 cells was recorded 24 h after treatments with BSA or BSA-AGEs (50 μ M) for 24 h. **A-C:** measurement by OROBOROS Oxygraph-2 k; **A)** Spontaneous mitochondrial respiration. **B)** state 4 respiration (in the presence of oligomycin) and **C)** maximal respiration (in the presence of DNP). **D-F:** measurement by Seahorse XF Analyzer; **D)** Spontaneous mitochondrial respiration. **E)** state 4 respiration (in the presence of oligomycin) and **F)** maximal respiration (in the presence of DNP). Bars represent the mean $\pm$ SD of oxygen consumption in percentage versus vehicle condition ($n = 6-8$). *Effect of BSA-AGEs (vs. BSA). * $p < 0.05$ determined by a Student t-test.

associated with an altered mitochondrial respiration and decreased ROS intracellular level in the presence of DNP. This impairment of bEnd.3 mitochondria metabolism upon BSA-AGEs-induced intracellular oxidative stress noticeably induces an alteration of the endothelial barrier impermeability. In addition, the role of ROS in the alteration of mitochondrial respiration was clearly evidenced by the analysis of respiratory parameters in the presence of NAC.

In diabetic patients, chronic hyperglycemia is favorable to the formation of AGEs. Elevated concentrations of AGEs derived from serum

albumin represent a typical “blood fingerprint” in T2DM (Cohen, 2003). Circulating AGEs can interact with endothelial cells via the RAGE (receptor for AGEs), leading to vascular complications (Wautier et al., 2014). Some residues found in AGEs, such as Ne-carboxymethyl-lysine or hydroimidazolones, are known to bind with the RAGE (Luévano-Contreras et al., 2017). In a previous analysis by MALDI-TOF-MS peptide mapping, we demonstrated that these residues are more abundant in MGO-modified albumin than in the native protein (Dobi et al., 2019). AGEs/RAGE interaction triggers intracellular oxidative stress resulting

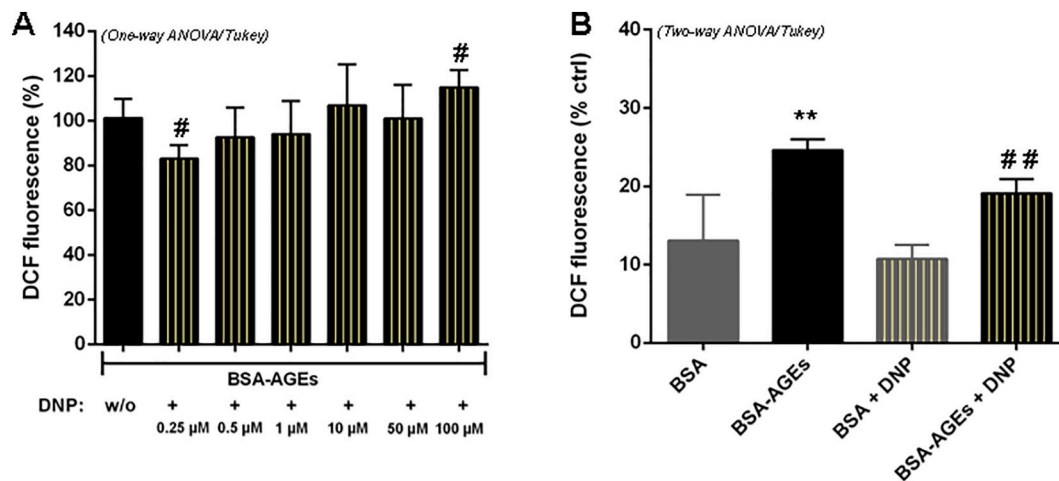


Fig. 4. DNP modulates ROS production in BSA-AGEs-treated cells.

A) ROS levels were determined with H_2DCF -DA probe in bEnd.3 cells treated with BSA or BSA-AGEs at 50 μ M for 24 h, and then co-incubated with or without (w/o) DNP (0.25 to 100 μ M) for an additional 45 min. **B)** ROS levels were measured in cells treated with BSA or BSA-AGEs at 50 μ M for 24 h, and then co-incubated with or without DNP at 0.25 μ M for an additional 45 min. Bars represent the mean $\pm$ SD of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCF) fluorescence normalized in percentage ($n = 3-4$). *Effect of BSA-AGEs (vs. BSA). ** $p < 0.01$. #Effect of DNP (vs. BSA-AGEs). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ determined by Tukey's *post hoc* analysis following a significant one way ANOVA (for A) or a two way ANOVA (for B).

in the activation of several pathways including p21ras, mitogen activated protein kinases (MAP-kinases) or protein kinase C (PKC) (Cohen et al., 2003; Giacco and Brownlee, 2010).

At the level of BBB microvasculature, oxidative stress generated by AGEs is associated with the disruption of endothelial cells' cohesion with adverse effects on the function of barrier. We used bEnd.3 cells to reproduce brain microvasculature *in vitro* and evaluate its permeability with fluorescently labeled tracers, i.e. dextran molecules (non-digestible sugars). Since pinocytosis is a very slow process and transcytosis of dextran has not been reported thus far in endothelial cells, the increased permeability observed in the presence of BSA-AGEs seems to occur via the paracellular route (Frost et al., 2019). Oxidative stress plays a dominant role in this outcome. Indeed, using BSA-AGEs, Niiya et al. showed that a hyperpermeability of endothelial cell monolayers (particularly from brain microvascular cells) to FD4 is a consequence of an excessive production of intracellular superoxide anions (Niiya et al., 2012). Our data indicated that hydrogen peroxide (measured by H_2DCF -DA probe) is also involved in this phenomenon. If H_2DCF -DA is commonly used for measuring intracellular H_2O_2 , the oxidation of this fluorescent probe by H_2O_2 is not direct and its reactivity toward other oxidant species, such as hydroxyl radical, carbonate radical, nitrogen dioxide and thiyl radicals could occur (Wojtala et al., 2014). Therefore, H_2O_2 , but also other ROS, are involved in the increased endothelial permeability observed in the presence of BSA-AGEs.

Studies performed on other models of brain microvascular endothelial cells revealed a redistribution of the tight junction proteins occludin, and zonula occludens (ZO) mediated by ROS, leading to a rise in paracellular permeability (Fischer et al., 2005; Lee et al., 2004). In a context of hypoxia/reoxygenation, Fischer et al. associated this hyperpermeability with phospholipase C activation and intracellular calcium elevation followed by the phosphorylation of MAP kinases (Fischer et al., 2005). It is well known that the assembly and stabilization of tight junctions is dependent on actin cytoskeleton dynamics. As mentioned by Prasain and Stevens about F-actin, "a tightly controlled balance of polymerization and depolymerization is necessary to maintain cell shape and control the endothelial cell barrier function" (Prasain and Stevens, 2009). Indeed, a recent study on primary mouse brain microvascular endothelial cells reported that ROS derived from the AGEs/RAGE signaling pathway downregulate the expression of actin depolymerizing factor. This modulation was accompanied by a formation of F-actin stress fibers, a decrease in ZO-1 expression and an increase in

endothelial permeability (Liu et al., 2017). *In vivo* investigations conducted on streptozotocin-induced diabetic rats support these results, in which enhanced endothelial leakage in the retinal microvasculature is associated with large amounts of F-actin stress fibers (Yu et al., 2005), and the levels of ZO-1 and occluding are reduced in cerebral microvessels (Hawkins et al., 2007). The loss of endothelial tight junction proteins under diabetic conditions has been also related to the expression of others proteins, such as matrix metalloproteinases and vascular endothelial growth factor (VEGF), both involved in amplified cell permeability (Hawkins et al., 2007; Shimizu et al., 2013).

In addition to tight junctions, the permeability of the BBB is also regulated by different transporters including efflux and influx transporters. Diabetic situations may affect transporters such as P-glycoprotein (Pgp), low density, lipoprotein receptor-related protein 1, and the insulin transporter alteration (Banks, 2020). As hyperglycemia could lead to AGE, some effects on transporters could involve RAGE activation (Park et al., 2014). As these transporters needs ATP, modification of the ATP production may interfere with these proteins functions (Pahnke et al., 2013).

Although numerous studies described the impact of AGEs on endothelial function, very few of them focused on mitochondria that are potential source of ROS. This is particularly the case for microvascular endothelial cells. In this study, the involvement of mitochondria in BSA-AGEs induced oxidative stress was evidenced by a significant upregulation of the mitochondrial superoxide dismutase (SOD2). If several studies reported an increased SOD activity in diabetic condition (Aouacheri et al., 2015; Seghrouchni et al., 2002), other works rather showed a decrease in this antioxidant activity (Kesavulu et al., 2000; Sundaram et al., 1996). These discrepancies could be attributed to both SOD isoforms. In a previous work we reported a down-regulation of SOD1 activity parallel to up-regulation of SOD2 activity in mouse diabetic liver (Patche et al., 2017). Here, the increase in SOD2 activity suggests a possible adaptive response, probably due to mitochondrial oxidative stress. Oxidative stress can activate several cytoplasmic factors, including NF- κ B, p53, mTOR, ERK and p38 MAPKs, which then translocate into the nucleus and induce the expression of SOD2 gene (Candas and Li, 2014).

For investigating the effect of BSA-AGEs on bEnd.3 mitochondrial respiration two different technologies were used: Oroboros and Seahorse. With the Oroboros, a Clark-type oxygen electrode was used, whereas with the Seahorse, fluorescence quenching by oxygen was

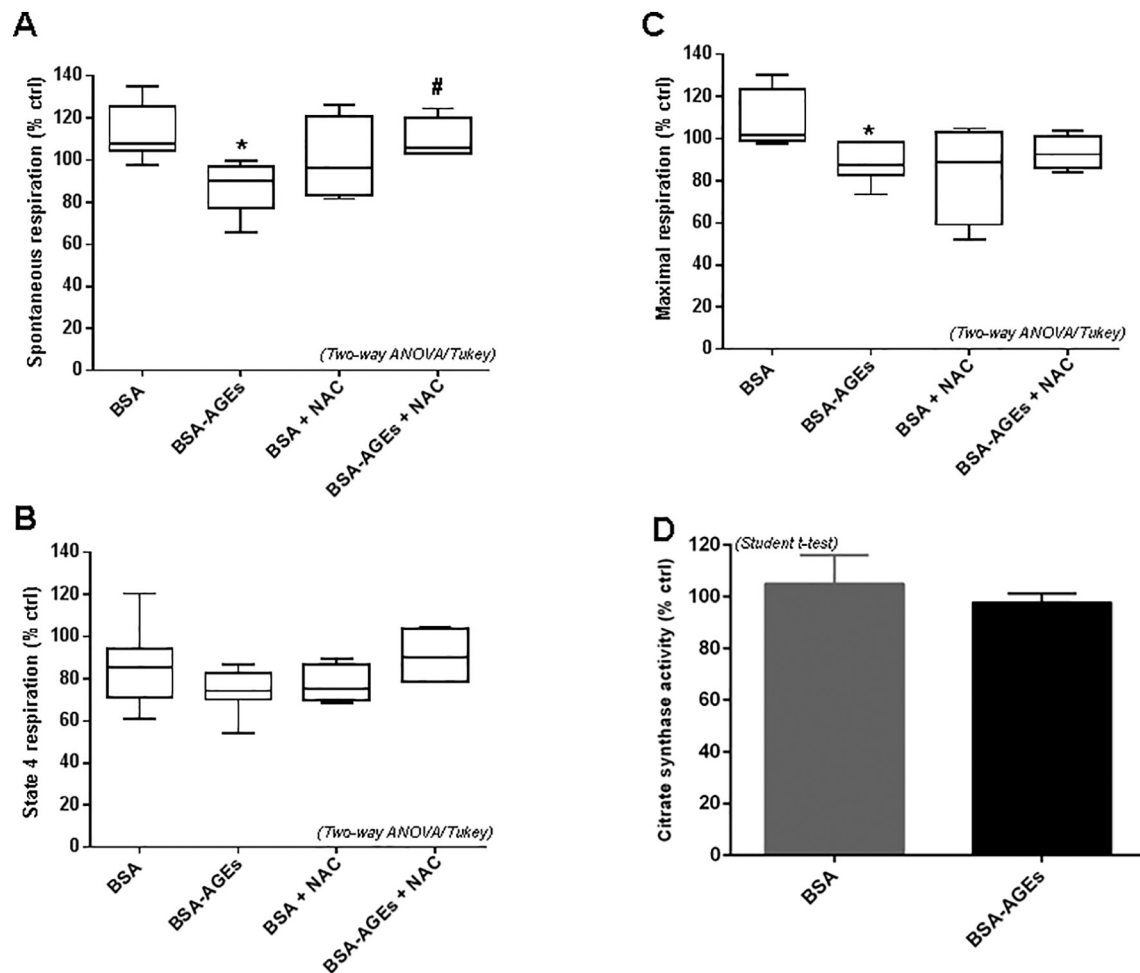


Fig. 5. BSA-AGEs induced bEnd.3 oxidative stress was rather due to reduced mitochondrial respiration.

Oxygen consumption by bEnd.3 cells was recorded 24 h after treatments with BSA or BSA-AGEs at 50 μ M for 24 h, in the presence or absence of 0.5 mM NAC. **A)** Spontaneous mitochondrial respiration, **B)** state 4 respiration and **C)** maximal respiration were measured in each condition using OROBOROS Oxygraph-2 k. **D)** Biomarker of mitochondrial content, citrate synthase activity was determined in lysates from bEnd.3 cells 24 h after treatment. Bars represent the mean $\pm$ SD of the studied parameter in percentage versus vehicle condition ($n = 6-8$). **E)** SOD2 activity was determined in lysates from cells treated with BSA or BSA-AGEs (50 mM) for 24 h, in the presence or absence of 0.5 mM NAC. Bars represent the mean $\pm$ SD of the enzyme activity in percentage versus vehicle condition ($n = 3$). *Effect of BSA-AGEs (vs. BSA). * $p < 0.05$. #Effect of NAC (vs. BSA-AGEs). # $p < 0.05$ determined by Tukey's *post hoc* analysis following a two way ANOVA (for A, B, C and E).

measured. Moreover, the biological state in which bEnd.3 cells are during the time of analysis was not the same. With Oroboros the measurement was performed on cells suspension while with the Seahorse the measurement was made directly on the adherent cells. Here, the investigation with both instruments allows to show a similar alteration of mitochondrial respiration in bEnd.3 cells upon BSA-AGEs condition. This altered mitochondrial oxygen consumption suggests a decrease in the rate of electron transfer along the mitochondrial respiratory chain. This slowing of electron transfer is an outcome that is recognized to promote ROS production.

As regards macrovascular endothelial cells exposed to AGEs, a dysfunction of the mitochondrial respiratory chain has been previously reported, in parallel with ROS overproduction (Liu et al., 2017; Ren et al., 2017; Sangle et al., 2010). In accordance with our data showing the possible involvement of mitochondria in barrier properties of bEnd.3 cells, Doll et al. (2015) established that maintenance of mitochondrial function is critical to the integrity of the BBB. Using pharmacological inhibitors of mitochondria they showed a disruption in tight junctions (ZO-1) and increased endothelial permeability in bEnd.3 cells. These results were confirmed in a murine model with an epidural application of the mitochondrial toxicant, rotenone (Doll et al., 2015).

In conclusion, we propose a mechanistic scheme in which AGEs

induces oxidative stress in cerebral microvascular endothelial cells contributing to vascular hyperpermeability (Fig. 6). Dysfunctional mitochondria can generate high levels of ROS (Kluge et al., 2013) and mitochondria are directly impacted by excessive ROS production. They further contribute to enhance the ROS production through a decrease in oxygen consumption rate. Given that T2DM is a metabolic disease associated with chronic pro-oxidant events, interventions utilizing anti-oxidant strategies to prevent or limit mitochondrial alterations, such as polyphenol-based therapies (Liu et al., 2013) offer a novel therapeutic intervention. Additional consideration can be made to the possible approach of inducing the overexpression of uncoupling proteins (UCPs) that are known to decrease mitochondrial ROS formation and preserve endothelial function (Tang et al., 2014).

CRedit authorship contribution statement

Conception and design of the experiments, experiment investigation, methodology and data analysis by A.D., C.L.H and P.R.; Additional experiment by S.R.; supervision by C.L.H and P.R.; Writing-original draft by A.D., C.L.H and P.R.; Review and edition by A.D., C.L.H, P.R., A.D., J. H., O.M. and P.B.

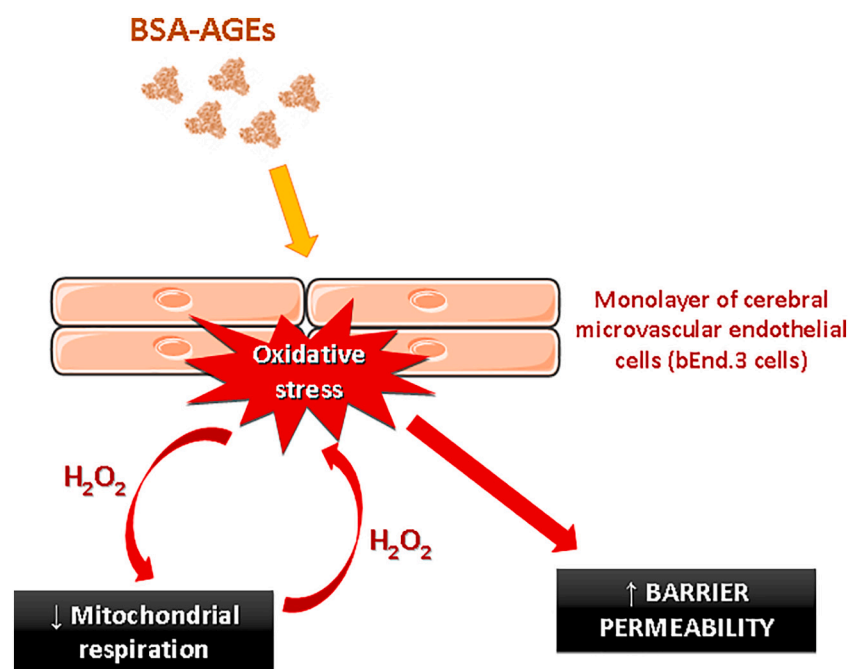


Fig. 6. Proposed model for BSA-AGEs-induced an increase in endothelial cell barrier permeability related to oxidative stress and mitochondrial respiration.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This work was supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, the Université de La Réunion, by the European Regional Development Fund RE0001897 (EU- Région Réunion -French State national counterpart) and by NIH Intramural Research funding Z01 ES021164-12 in the Division of National Toxicology Program. AD is supported by a fellowship from the Conseil Régional de La Réunion et l'Europe. We would like to thanks Dr. R Cannon and Dr. P Ravanan for their reading and input in the manuscript.

References

- Aouacheri, O., et al., 2015. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can. J. Diabetes* 39, 44–49.
- Banks, W.A., 2020. The blood-brain barrier interface in diabetes mellitus: dysfunctions, mechanisms and approaches to treatment. *Curr. Pharm. Des.* 26, 1438–1447.
- Baraka-Vidot, J., et al., 2015. Glycation alters ligand binding, enzymatic, and pharmacological properties of human albumin. *Biochemistry* 54, 3051–3062.
- Baret, P., et al., 2018. Glycated human albumin alters mitochondrial respiration in preadipocyte 3T3-L1 cells. *Biofactors* 43, 577–592.
- Brosnan, C., Claudio, L., Brain microvasculature in multiple sclerosis. In: W. M. Pardridge, (Ed.), *Introduction to the Blood-brain Barrier: Methodology, Biology and Pathology*. Cambridge University Press, cop. 1998., Cambridge; N. Y. 1998.
- Candas, D., Li, J.J., 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1599–1617.
- Cohen, M.P., 2003. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 419, 25–30.
- Cohen, M.P., et al., 2003. Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF- κ B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1 production in macrophage RAW cells. *J. Lab. Clin. Med.* 141, 242–249.
- Davidson, S.M., Duchon, M.R., 2007. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease. *Circ. Res.* 100, 1128–1141.
- Dobi, A., et al., 2019. Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production. *Free Radic. Res.* 53, 150–169.
- Doll, D.N., et al., 2015. Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the blood-brain barrier. *Stroke* 46, 1681–1689.
- Dranka, B.P., et al., 2011. Assessing bioenergetic function in response to oxidative stress by metabolic profiling. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1621–1635.
- Ergul, A., et al., 2012. Cerebrovascular complications of diabetes: focus on stroke. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 12, 148–158.
- Fischer, S., et al., 2005. H₂O₂ induces paracellular permeability of porcine brain-derived microvascular endothelial cells by activation of the p44/42 MAP kinase pathway. *Eur. J. Cell Biol.* 84, 687–697.
- Freeman, L.R., Keller, J.N., 2012. Oxidative stress and cerebral endothelial cells: regulation of the blood-brain-barrier and antioxidant based interventions. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 822–829.
- Frost, T.S., et al., 2019. Permeability of epithelial/endothelial barriers in transwells and microfluidic bilayer devices. *Micromachines (Basel)* 10.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* 107, 1058–1070.
- Guerin-Dubourg, A., et al., 2012. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* 38, 171–178.
- Hawkins, B.T., et al., 2007. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 50, 202–211.
- Huber, J.D., 2008. Diabetes, cognitive function, and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 14, 1594–1600.
- Ikeda, M., et al., 2002. Synergistic effect of cold mannitol and Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker on blood-brain barrier opening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 669–674.
- Karimian, K., et al., 1986. Uncoupling effects of 2,4-dinitrophenol on electron transfer reactions and cell bioenergetics in rat brain in situ. *Brain Res.* 366, 300–306.
- Kawamura, T., et al., 2012. Cognitive impairment in diabetic patients: can diabetic control prevent cognitive decline? *J. Diabetes Investig.* 3, 413–423.
- Kesavulu, M.M., et al., 2000. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 26, 387–392.
- Kluge, M.A., et al., 2013. Mitochondria and endothelial function. *Circ. Res.* 112, 1171–1188.
- Larsen, S., et al., 2012. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360.
- Lee, H.S., et al., 2004. Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* 68, 231–238.
- Liu, X., et al., 2013. Green tea polyphenols alleviate early BBB damage during experimental focal cerebral ischemia through regulating tight junctions and PKC α signaling. *BMC Complement. Altern. Med.* 13, 187.
- Liu, X., et al., 2017. The role of actin depolymerizing factor in advanced glycation endproducts-induced impairment in mouse brain microvascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 433, 103–112.
- Luévano-Contreras, C., et al., 2017. Dietary advanced glycation end products and cardiometabolic risk. *Curr. Diab Rep* 17, 63.
- Luissint, A.C., et al., 2012. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23.
- Niyya, Y., et al., 2012. Advanced glycation end products increase permeability of brain microvascular endothelial cells through reactive oxygen species-induced vascular endothelial growth factor expression. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 21, 293–298.

- Oldendorf, W.H., et al., 1977. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* 1, 409–417.
- Pahnke, J., et al., 2013. Impaired mitochondrial energy production and ABC transporter function—a crucial interconnection in dementing proteopathies of the brain. *Mech. Ageing Dev.* 134, 506–515.
- Paradela-Dobarro, B., et al., 2016. Key structural and functional differences between early and advanced glycation products. *J. Mol. Endocrinol.* 56, 23–37.
- Park, Y.Y., et al., 2014. MARCH5-mediated quality control on acetylated Mfn1 facilitates mitochondrial homeostasis and cell survival. *Cell Death Dis.* 5, e1172.
- Patche, J., et al., 2017. Diabetes-induced hepatic oxidative stress: a new pathogenic role for glycated albumin. *Free Radic. Biol. Med.* 102, 133–148.
- Peters, T.J., 1996. *All About Albumin - Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press, San Diego.
- Prasad, S., et al., 2014. Diabetes mellitus and blood-brain barrier dysfunction: an overview. *Journal of pharmacovigilance.* 2, 125.
- Prasain, N., Stevens, T., 2009. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* 77, 53–63.
- Pugazhenth, S., et al., 2017. Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. basis Dis.* 1863, 1037–1045.
- Rapoport, S.I., 2000. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 217–230.
- Ren, X., et al., 2017. Advanced glycation end-products decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc. Diabetol.* 16, 52.
- Rondeau, P., Bourdon, E., 2011. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie.* 93, 645–658.
- Saedi, E., et al., 2016. Diabetes mellitus and cognitive impairments. *World J. Diabetes* 7, 412–422.
- Sangle, G.V., et al., 2010. Impairment of mitochondrial respiratory chain activity in aortic endothelial cells induced by glycated low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 781–790.
- Seghrouchni, I., et al., 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin. Chim. Acta* 321, 89–96.
- Shahriyari, L., et al., 2018. Effect of glycated insulin on the blood-brain barrier permeability: an in vitro study. *Arch. Biochem. Biophys.* 647, 54–66.
- Shimizu, F., et al., 2013. Advanced glycation end-products disrupt the blood-brain barrier by stimulating the release of transforming growth factor-beta by pericytes and vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 by endothelial cells in vitro. *Neurobiol. Aging* 34, 1902–1912.
- Storz, P., et al., 2005. Protein kinase D mediates mitochondrion-to-nucleus signaling and detoxification from mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8520–8530.
- Sundaram, R.K., et al., 1996. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin. Sci. (Lond.)* 90, 255–260.
- Tang, X., et al., 2014. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front. Physiol.* 5, 175.
- Venkat, P., et al., 2017. Blood-brain barrier disruption, vascular impairment, and ischemia/reperfusion damage in diabetic stroke. *J. Am. Heart Assoc.* 6.
- Watanabe, T., et al., 2013. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 492–495.
- Wautier, M.P., et al., 2014. Advanced glycation end products: a risk factor for human health. *Ann. Pharm. Fr.* 72, 400–408.
- Wojtala, A., et al., 2014. Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. *Methods Enzymol.* 542, 243–262.
- Yu, P.K., et al., 2005. Endothelial F-actin cytoskeleton in the retinal vasculature of normal and diabetic rats. *Curr. Eye Res.* 30, 279–290.

Article

Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection

Daed El Safadi ¹, Grégoire Lebeau ¹, Alisé Lagrave ¹, Julien Mélade ¹, Lauriane Grondin ¹, Sarah Rosanaly ², Florian Begue ², Mathilde Hoareau ¹, Bryan Veeren ², Marjolaine Roche ¹, Jean-Jacques Hoarau ¹, Olivier Meilhac ², Patrick Mavingui ¹, Philippe Desprès ¹, Wildriss Viranaïcken ^{1,*} and Pascale Krejbich-Trotot ^{1,*}

¹ Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Plateforme Technologique CYROI, 97490 Saint-Denis de La Réunion, France

² Unité Mixte Diabète Athéromatose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROI), Université de la Réunion, INSERM, UMR 1188, Plateforme Technologique CYROI, 97490 Saint-Denis de La Réunion, France

* Correspondence: wildriss.viranaïcken@univ-reunion.fr (W.V.); pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K.-T.)

Abstract: Extracellular vesicles (EVs), produced during viral infections, are of emerging interest in understanding infectious processes and host–pathogen interactions. EVs and exosomes in particular have the natural ability to transport nucleic acids, proteins, and other components of cellular or viral origin. Thus, they participate in intercellular communication, immune responses, and infectious and pathophysiological processes. Some viruses are known to hijack the cell production and content of EVs for their benefit. Here, we investigate whether two pathogenic flaviviruses i.e., Zika Virus (ZIKV) and Dengue virus (DENV2) could have an impact on the features of EVs. The analysis of EVs produced by infected cells allowed us to identify that the non-structural protein 1 (NS1), described as a viral toxin, is associated with exosomes. This observation could be confirmed under conditions of overexpression of recombinant NS1 from each flavivirus. Using different isolation methods (i.e., exosome isolation kit, size exclusion chromatography, Polyethylene Glycol enrichment, and ELISA capture), we showed that NS1 was present as a dimer at the surface of excreted exosomes, and that this association could occur in the extracellular compartment. This finding could be of major importance in a physiological context. Indeed, this capacity of NS1 to address EVs and its implication in the pathophysiology during Dengue or Zika diseases should be explored. Furthermore, exosomes that have demonstrated a natural capacity to vectorize NS1 could serve as useful tools for vaccine development.

Keywords: flavivirus; Dengue; Zika; NS1; exosome; viral toxin vectorization



Citation: Safadi, D.E.; Lebeau, G.; Lagrave, A.; Mélade, J.; Grondin, L.; Rosanaly, S.; Begue, F.; Hoareau, M.; Veeren, B.; Roche, M.; et al. Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection. *Viruses* **2023**, *15*, 364. <https://doi.org/10.3390/v15020364>

Academic Editor: Helle Bielefeldt-Ohmann

Received: 29 December 2022

Revised: 19 January 2023

Accepted: 24 January 2023

Published: 27 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In the last few decades, the emergence or re-emergence of RNA viruses has led to an increased number of epidemics able to expand rapidly over large areas. Arboviruses are a particular growing threat, with several medical concerns [1]. In particular, Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) from the flavivirus genus of the Flaviviridae family, which were discovered in the mid-20th century, have gained public awareness. Both are pathogenic flaviviruses mainly transmitted by *Aedes* spp. mosquitoes. Climate and environmental changes that favor the expansion of these mosquitoes beyond the tropics, and the lack of validated treatments and vaccines, increase the risk that these viruses will affect more people worldwide [2,3]. Dengue virus, which exists in four serotypes, could affect more than 50% of the world's population by 2050 [4,5]. The number of annual human infections is currently estimated at 400 million, with only 10% of febrile disease cases reported to the WHO. About 500,000 of these infections require hospitalization and more than 20,000 lead to death [6]. The infectious pathology

and its evolution are polymorphic. The risk factors for disease progression to severe forms (mainly related to dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome) are still under debate. The main suggested cause is related to the magnitude of viremia, which could be associated with the virus serotype or genotype, although none of the four serotypes have been clearly identified as more pathogenic than the others. A recurring hypothesis links pathogenicity to a secondary dengue event, with intervals between infections resulting in an antibody facilitation mechanism and an exacerbated inflammatory immune response that contributes to vascular leakage. Finally, the impact of host factors as well as the roles of specific viral factors have also been extensively discussed [7,8].

Regarding ZIKV, long considered harmless with very few cases of human infection, epidemics in the Pacific Islands (2007–2014) and then in Brazil (2015) have highlighted the threat that this virus represents for the human population [9,10]. During these outbreaks, an increasing number of serious outcomes of the infection, including Guillain-Barré syndrome in adults and congenital zika syndrome (CZS), have pointed out the danger of this lesser-known infectious agent [11–13]. In addition, evidence of maternal–fetal and sexual transmission, as well as viral persistence in certain biological fluids, have highlighted specific characteristics of ZIKV within the flavivirus genus [14]. All of these concerns have led to a global effort in ZIKV research, notably to decipher its pathophysiology and to develop a vaccine to prevent severe forms of infection. However, for both flaviviruses, the exact mechanisms behind the different pathological consequences of the infection remain poorly understood.

Among the viral factors suspected of influencing the outcome of the disease induced by these two flaviviruses, the non-structural protein 1 (NS1) is outstanding. During an infection, this viral protein circulates in the blood and is reported to act as a toxin. Briefly, DENV and ZIKV genomes encode a polyprotein processed in seven non-structural (NS) and three structural proteins. During the maturation process, NS1 is cleaved and released into the lumen of the endoplasmic reticulum, where its N-glycosylation leads to a protein whose monomer has a molecular weight of 46–55 kDa [15]. NS1 is a multifaceted glycoprotein that forms homodimers when associated with the ER lumen and organelle membranes, and hexamers that are released from infected cells after maturation in the trans-Golgi network. The levels of circulating NS1 in the bloodstream are variable, reaching up to $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in the case of dengue [16], whereas during ZIKV infection the level of soluble NS1 found in the extracellular compartment is about $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [17]. In both cases, NS1 detection in the serum of patients can be used for diagnosis [18,19]. NS1 is a conserved glycoprotein among flaviviruses, with structural similarity and sequence identities in the range of 53–56% between DENV-NS1 and ZIKV-NS1 [20], however, the ZIKV-NS1 protein has not been studied as extensively as DENV-NS1. During DENV infection, NS1 is known to act as a scaffolding protein, promoting the formation of vesicle packets which host the viral replication machinery [21,22]. DENV-NS1 has also been shown to interact with components from both the innate and adaptive immune systems, thereby participating in immune evasion [23,24]. The circulating form has been associated with the development of severe forms of infection due to vascular leakage [22]. DENV-NS1, described as a viral toxin, may contribute to functional alterations of the endothelium in both cytokine-dependent [25,26] and independent manners [27]. The mechanisms involved include disruption of intercellular junctions and damage of the glycocalyx [27,28]. Recently, it has also been reported that ZIKV-NS1 can alter the junctional integrity of the endothelial cells composing the blood–brain barrier [26,29]. However, the exact underlying mechanisms of the endothelial and epithelial barrier dysfunctions and the fragility observed during ZIKV and DENV infections are not fully understood.

Exosomes are widespread small extracellular vesicles (EVs) of endosomal origin, with a heterogeneous diameter ranging from 30 to 150 nm [30]. They are produced by a variety of eukaryotic cells [31] and play a crucial role, ensuring intercellular communication and

maintaining biological homeostasis [32]. This is due to their ability to transport and deliver to target cells a wide variety of molecules such as nucleic acids, metabolites, lipids, and proteins [33]. Exosomes can be distinguished from other EVs, especially those produced from the plasma membrane, by their smaller size and by various markers such as tetraspanins (CD63, CD81, CD9), TSG101, and others [34,35]. Indubitably, exosomes are nowadays a matter of special concern due to their recent involvement in pathophysiological processes such as cancer [36,37], neurodegenerative diseases [38], cardiovascular disease [39], metabolic syndrome [40,41], and even fibrosis [42,43].

Additionally, links between exosomes and infection have been explored. Their role in the progression of infection seems ambivalent, both anti-infectious by promoting immune responses and activation of immune cells, and pro-infectious by transmitting molecules of the pathogen and assisting it precisely in immune escape [44]. The involvement of exosomes in the dissemination and pathogenesis of intracellular pathogens is highly questioned because of their ability to traffic from and to plasma membranes across the endosomal pathway [35]. For example, the hepatitis C virus (HCV), a member of the Flaviviridae family, can hijack exosomal biogenesis to package its own genome into intraluminal vesicles, producing pseudo-viral yet infective particles [45,46]. HCV can also incorporate its E2 protein into exosomes, leading to increased susceptibility of recipient cells [47]. The same was recently observed with viral protein and RNA uptake by exosomes during the infection of epithelial cells with chikungunya virus [48]. In the case of dengue infection, exosomes have even been proposed as a possible “missing link” in the development of dengue hemorrhagic fever [49,50]. For Zika, EVs derived from ZIKV-infected endothelial cells and carrying ZIKV components may have the capacity to disturb the blood–brain barrier [51]. Despite these recent findings, much remains to be clarified about the specific characteristics of exosomes produced during infection with pathogenic flaviviruses, their ability to convey viral factors and their role in the development of virus-related diseases. Here, we wondered whether ZIKV and DENV2 infections could affect the exosomes produced in the extracellular compartment, and found that the NS1 protein is associated with these EVs. We then obtained cells stably expressing ZIKV-NS1 or DENV-NS1 to better characterize the NS1 protein association with exosomes.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture, Viruses, and Infection

A549-Dual™ cells (InvivoGen, Toulouse, France, a549d-nfis), designated hereafter as A549 cells, were cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in 4.5 g·L^{−1} glucose Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) (PAN Biotech Dutscher, Brumath, France), supplemented with 1% or 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Dutscher, Brumath, France), 100 U·mL^{−1} penicillin, 100 µg·mL^{−1} streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 0.5 µg·mL^{−1} amphotericin B (PAN Biotech, Dutscher, Brumath, France), and supplemented with 10 µg·mL^{−1} blasticidin and 100 µg·mL^{−1} zeocin (InvivoGen, Toulouse, France). Human Embryonic Kidney, HEK 293T (CRL-3216) was cultured at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere in DMEM, supplemented with 5% or 10% heat-inactivated FBS. For exosome purification, cells were grown in 1% FBS media or in Panserin 401 (PAN Biotech Dutscher, Brumath, France). The ZIKV clinical isolate PF-25013-18 (PF13) has been previously used and described [52]. The DENV2 clinical isolate, strain UVE/DENV2/2018/RE/47099 was provided by the H2020 European Virus Archive goes global (EVAg). The two flaviviruses were amplified on Vero E6 cells and titrated by plaque-forming unit assay before infection of the A549 cells at a multiplicity of infection (moi) of 5 for 48 h for ZIKV and 72 h for DENV2.

2.2. Flow Cytometry Assay of Infected Cells

To detect infected cells, we used the mouse anti-pan flavivirus envelope E protein mAb 4G2, produced by RD Biotech (1:1000 in PBS-BSA 1%). A549 cells were first harvested,

fixed with 3.7% PFA in PBS for 10 min, then permeabilized for 5 min with PBS 1X 0.15% Triton X-100, and incubated with mAb 4G2 for 2 h, followed by 30 min of incubation with Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibody (1:1000 in PBS-BSA 1%). The cells were washed with PBS and then subjected to flow cytometric analysis using Cytotflex (Beckman, Brea, CA, USA). Results were analyzed using cytExpert software, CytExpert version 2.4.

2.3. Plasmids and Transfection

For the expression of the recombinant ZIKV-NS1^{FLAG-tag}, the construct was the one we previously designed, characterized, and used [53]. It is based on cloning of the NS1 sequence of the ZIKV BeH819015 strain into the pcDNA3.1(+) Neo plasmid. Mammalian codon-optimized gene coding NS1 of DENV2 (UVE/DENV2/2018/RE/47099) was established using *Cricetulus griseus* codon usage as reference. A sequence encoding an optimized secretory signal peptide [54] and a V5 tag were added respectively upstream and downstream of the synthetic NS1 sequence. The NS1 coding sequence was inserted upstream of an IRES that allows the translation of a puromycin resistance gene. The synthesis of the bicistronic gene sequence and its subcloning into Nhe-I and Xba-I restriction sites of the pcDNA3.1(+) Neo vector, to generate pcDNA3.1-NS1-DV2^{V5-tag}, were performed by Genecust (Boynes, France). As control, using the same design, a sequence encoding the secreted embryonic alkaline phosphatase with a His tag (SEAP, Uniprot: P05187) was subcloned into the pcDNA3.1(+) Neo vector for pcDNA3.1-SEAP^{HIS-tag}.

At 70–80% of cell confluence, HEK 293 cells were transfected by lipofection using LipofectamineTM 3000 reagent (L3000-015, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations, with 2.5 µg of DNA.

In order to obtain stable HEK 293, cell lines expressing either ZIKV-NS1^{FLAG-tag}, DENV2-NS1^{V5-tag} proteins, or SEAP^{HIS-tag}, were further selected using geneticin or puromycin at 2 µg·mL^{−1} and maintained in culture in complete DMEM supplemented with the antibiotic at the same concentration.

2.4. Exosomes Sampling and Functional Assay of Interfering the Exosome Biogenesis

For comparison and optimization purposes, several techniques for extracting exosome fractions were used in our study. The presence of classical markers of exosomes, i.e., CD63 and CD81, was verified on the fractions isolated by these techniques.

2.4.1. Exoeasy Maxi Kit[®]

Exosomes were purified from cell culture supernatants (CCS) using Exoeasy Maxi kit[®] (Qiagen, 76064) according to manufacturer's instructions. Briefly, cell culture supernatants (CCS) were collected and centrifuged for 10 min at 1000× g. For A549 infected cells, prior to exosome extraction and in order to inactivate the viruses, CCS were exposed to 1000 J/m² of UV light for 15 min. 7 mL of buffer XBP was added to 7 mL of CCS and loaded on Exoeasy columns. Columns were centrifuged at 500× g for 1 min. Then, XWP buffer was added to the column followed by centrifugation at 5000× g for 5 min. Finally, exosomes were eluted from the column with 1 mL of XE buffer followed by centrifugation at 500× g for 5 min.

2.4.2. Ultrafiltration and Size Exclusion Chromatography

CCS of transfected HEK 293 cells was harvested and filtered with a 0.22 µm filter. Then, CCS was submitted to ultra-centrifugation (20 min-17,000× g at 4 °C) using Optima L-80 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter). The resulting supernatant was ultrafiltrated using a Vivaflow 200 cell with a cut-off of 100,000 Da (Sartorius, VF20H4) and finally concentrated to 1 mL. Purification of exosomes has also been performed using size exclusion chromatography (SEC) on ÄKTA PureTM chromatography system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) equipped with a 1 mL loop and a F9-C fraction collector. The 1 mL concentrated supernatant was injected on a double tandem Superose 6 Increase 10/300 GL column [55]. Unicorn software 7.0 was used for data collection

and analysis. During SEC, absorbance at 260–280 nm, conductivity, and pH were monitored. Fractions of 1 mL were harvested and processed for further studies.

2.4.3. PEG Exosome Purification

CCS was collected and centrifuged at $2000\times g$ for 30 min at 4 °C to remove apoptotic bodies and cellular debris (giving pellet P1 and supernatant S1). A Polyethylene Glycol (PEG) solution was prepared as described previously [56] and added to S1. The 10% PEG-S1 mixture was left at 4 °C overnight and then centrifuged at $3000\times g$ for 1 h. The pellet (P PEG) was resuspended in 11 mL of sterile PBS 1X. 1 mL was kept to perform the dot blot, and the remaining 10 mL was ultracentrifuged at $100,000\times g$ 4 °C without brake at an acceleration 5 using a rotor Sw41. The pellet (P2) containing the extracellular vesicles resulting from the ultracentrifugation was resuspended in 1 mL of PBS.

2.4.4. Functional Assay, Interfering the Exosome Biogenesis with GW4869

During the isolation of exosomes, co-elution of proteins may occur and constitute a source of contamination. This can lead to a misinterpretation of the association of these proteins with exosomal fractions [57]. To avoid this bias, it is usual to inhibit exosome biogenesis, in order to check the level of contamination during fractionation. We used GW4869 to inhibit exosome production. GW4869 is a strong inhibitor of neutral sphingomyelinases that, by preventing the formation of intraluminal vesicles, is able to block exosome production. Cells were treated overnight with 10 μ M GW4869. In parallel, control cells were treated with the same volume of DMSO. CCS were collected and exosome fractions were prepared using the Exoeasy Maxi kit[®].

2.5. Dynamic Light Scattering

The size and distribution of the exosomes were evaluated by dynamic light scattering (DLS) employing a Nano S Zetasizer (Malvern Instruments, Cambridge, United Kingdom) equipped with a light source from a 4 mW He-Ne laser ($\lambda = 633$ nm) and a scattering angle of 173°. Each sample was filtered on a 0.22 μ m membrane before analysis. The results were processed and analyzed using Zetasizer software v3.30 (Malvern, UK).

2.6. Western Blot, Dot Blot, Antibodies and Recombinant Proteins

For western blot assays, samples were lysed with TEN buffer (0.1 M Tris-Cl pH 8.0, 0.01 M EDTA pH 9.0, and 1 M NaCl) and treated in Laemmli buffer, processed by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane, as previously reported [46,47]. For dot blot assays, 2.5 μ L of CCS or cell extracts was spotted onto nitrocellulose membrane. Nitrocellulose membranes were first saturated for 30 min with TBS-5% milk-0.05% Tween. The blots were next incubated for 1 h with the appropriate dilution of primary antibody in TBS-2.5% milk-0.05% Tween. Primary antibodies used were, for NS1 detection, rabbit anti-Dengue Virus NS1 glycoprotein antibody [DN3] from Abcam (1:1000, ab41616), mouse anti-FLAG mAb (FLAG) (1:1000, Cell signaling technology, Danvers, MA, USA or 1:200, sc-166355, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-CD63 (1:200, sc-5275, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-CD81 (1:200, sc-23962, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-FLAG, mouse anti-V5, mouse anti-His, rat anti-albumin (1:1000, 04-100-812-E, Euromedex, Paris, France), rabbit anti- β -actin (1:1000, LF-PA0209, Abfrontier, Seoul, Korea). Anti-rabbit-coupled HRP and anti-mouse-coupled HRP antibodies were used as secondary antibodies (dilution 1:2000, Abcam, Cambridge, UK) in TBS-2.5% milk-0.05% Tween. The membranes were revealed with Pierce ECL Western blotting substrate (RPN 2232, Cytiva Life Sciences[™], Fisher Scientific, Illkirch, France) and exposed with an Amersham imager 600 (GE Healthcare). Recombinant ZIKV-NS1^{HIS-tag} (strain Zika SPH2015) and DENV2-NS1^{HIS-tag} (Dengue type 2, strain New Guinea C) were from Sino Biological.

2.7. ELISA Capture of Exosomes

MaxiSorp™ plates were coated at 4 °C overnight with mouse anti-CD81 antibody (1:100, sc-23962, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Then, saturation was processed with 100 µL/well of 1X assay diluent for 1 h under agitation. CCS of HEK293 stably expressing ZIKV-NS1^{FLAG-tag} was incubated for 2 h at room temperature. After a washing step, a mouse anti-FLAG antibody (1:100, sc-166355, Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was incubated for 1 h at room temperature under agitation. Finally, a goat anti-mouse-HRP antibody (ab6789, Abcam, Cambridge, UK) was added for 30 min at room temperature. Between each incubation step, wells were washed with PBS-Tween 0.05% three times. HRP activity was revealed using 50 µL of 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB solution, 00-4201-56, eBioscience, Inc., San Diego, CA USA, Invitrogen) as HRP substrate, and stopped with 50 µL of HCL 0.2 N. Absorbance was read at 450 nm, with a reference at 570 nm, using a Fluostar Omega microplate reader (BMG LabTech).

2.8. QUANTI-Blue Assay

Briefly, the supernatant of HEK293 transfected with SEAP was harvested and exosomes were purified using Exoeasy Maxi kit®, as mentioned above. After purification, Secreted Alkaline Phosphatase activity of each fraction was assessed using QUANTI-blue solution (Invivogen, San Diego, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. Briefly, 20 µL of crude supernatant, exosomes fraction, and flowthrough were incubated with 180 µL of QUANTI-blue solution at 37 °C for 1 h. The absorbance was then read at 620 nm using a Fluorstar Omega microplate reader (BMG LabTech, Ortenberg, Germany).

2.9. Statistical Analyses

Unpaired t-test and ordinary one-way ANOVA tests were performed for statistical analysis using Graph-Pad Prism software version 9. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The degrees of significance as well as the test used are indicated in the figure captions as follows: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns = not significant.

3. Results

3.1. Infection with ZIKV or DENV2 Results in the Co-Elution of NS1 with Exosomes

We first wondered whether infection with ZIKV or DENV2, with described NS1 secretion by infected cells, would affect vesicles found in the extracellular compartment. We performed in vitro infection of the human A549 epithelial cells, which are widely used because of their permissiveness to both Zika [52] and Dengue viruses [58]. Cells were infected at moi 5 and cell culture supernatants (CCS) were collected at 48 h post-infection for ZIKV, and 72 h for DENV2. These time points correspond to steps in the infection kinetics at which cytopathic effects are not yet prominent, thus limiting the amount of debris and apoptotic bodies in the CCS. Infection was monitored by measuring cells labeled with a pan-flavi antibody (4G2) by flow cytometry (Supplementary Figure S1). Exosomes were extracted from CCS using the Exoeasy Maxi kit® from Qiagen. Quantitative and qualitative aspects of exosomes fractions were first analyzed by dot blot and immunodetection of tetraspanins (using anti-CD63) (Figure 1A). The CD63 signal obtained suggests an increase in the quantity of exosomes under infection conditions. This was already reported in the literature for exosomes produced by DENV-infected mosquito cells [59]. In addition, the dot blot revealed that NS1 was co-eluted with exosomes (Figure 1A). A western blot confirmed that DENV2-NS1 protein was present in the exosome fraction in its dimeric form (Figure 1B). DLS analysis of the exosome profiles reveals a reshape in the distribution of vesicles after infection (Figure 1C). EVs tend to have increased sizes, which is confirmed by the observation of the z-average (Figure 1C and Table 1). The DLS intensity measurement, which gives the proportions of the different vesicle populations, depending on their size (Figure 1C), shows that during infection, the smallest vesicles increase in number

as well as in size. For the population of larger vesicles, their size increases slightly but their quantity decreases.

3.2. Overexpression of Recombinant ZIKV-NS1^{FLAG-tag} Protein and DENV2-NS1^{V5-tag} Lead to Co-Elution of NS1 with Exosome-Like Particles

To clarify the relationship between exosomes and NS1, stable expression of tagged-recombinant NS1 proteins from both ZIKV (ZIKV-NS1^{FLAG-tag}) and DENV2 (DENV2-NS1^{V5-tag}) was achieved by the transfection of HEK293. To ensure that any secreted protein does not end up in the exosome fraction, a stable HEK293 cell line was obtained by transfecting with a control construct allowing the expression and secretion of the secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) protein. Heterogeneous populations of cells expressing ZIKV-NS1^{FLAG-tag}, DENV2-NS1^{V5-tag}, or SEAP^{HIS-tag} were selected and maintained in media supplemented with their respective selective antibiotics. Stable overexpression and secretion of the two NS1 recombinant proteins were assessed with western blot analysis of the CCS, as shown in Figure 2A. Heat treatment of the CCS protein extract from the ZIKV-NS1^{FLAG-tag} stable HEK293 cell line results in a single band with an apparent molecular weight of ~48 kDa. This may correspond to the monomeric form of the previously described ZIKV-NS1 protein [60]. Consistent with this result, in the non-heat-treated condition, the signal at ~76 kDa band may be related to a dimeric form of NS1. For DENV2-NS1^{V5-tag}, heat treatment allows us to detect dimeric form at the expected apparent mass [61]. The hexameric forms could not be detected in our conditions. For the two cell lines overexpressing the NS1 of ZIKV and DENV2, respectively, western blot results indicate that the secreted NS1 protein is present in the CCS, mainly as a dimer, although we cannot exclude the presence of hexamers that we were not able to detect.

We then proceeded to the extraction of exosomes from CCS using Exoeasy Maxi kit[®]. We verified the exosome enrichment of our fractions by immunodetection of the tetraspanins (CD81 and CD63) (Figure 2B). We then investigated whether our secreted proteins were found in the exosome fractions. We found that although SEAP^{HIS-tag} was found in the supernatant (Figure 2C), where its activity was also detected by quantiblu measurement (Figure 2D), it was not found in the exosome fraction. We verified that SEAP was not contained within the vesicles as we could not detect it in the lysed exosomes (Figure 2C). When looking at the exosome fractions obtained from CCS of HEK cell lines that stably express NS1, we observe that both ZIKV-NS1 detected with the anti-flag and DV2-NS1 detected with the anti-V5 were co-eluted with exosomes (Figure 2C). Western blot analysis of the exosome protein extracts confirmed the presence of the NS1 proteins in the exosome fraction in their dimeric form (Figure 2E).

Table 1. Increased size of exosome during both ZIKV and DENV2 infection.

Sample	Z-Average (d.nm)	Standard Deviation	p-Value (vs.mock)
Mock	230.6	3.519	—
ZIKV	259.4	16.32	0.0057
DENV2	277.5	7.301	0.0001

Z-average: The Z-average is the intensity-weighted mean hydrodynamic size of the ensemble collection of particles measured by dynamic light scattering (DLS).

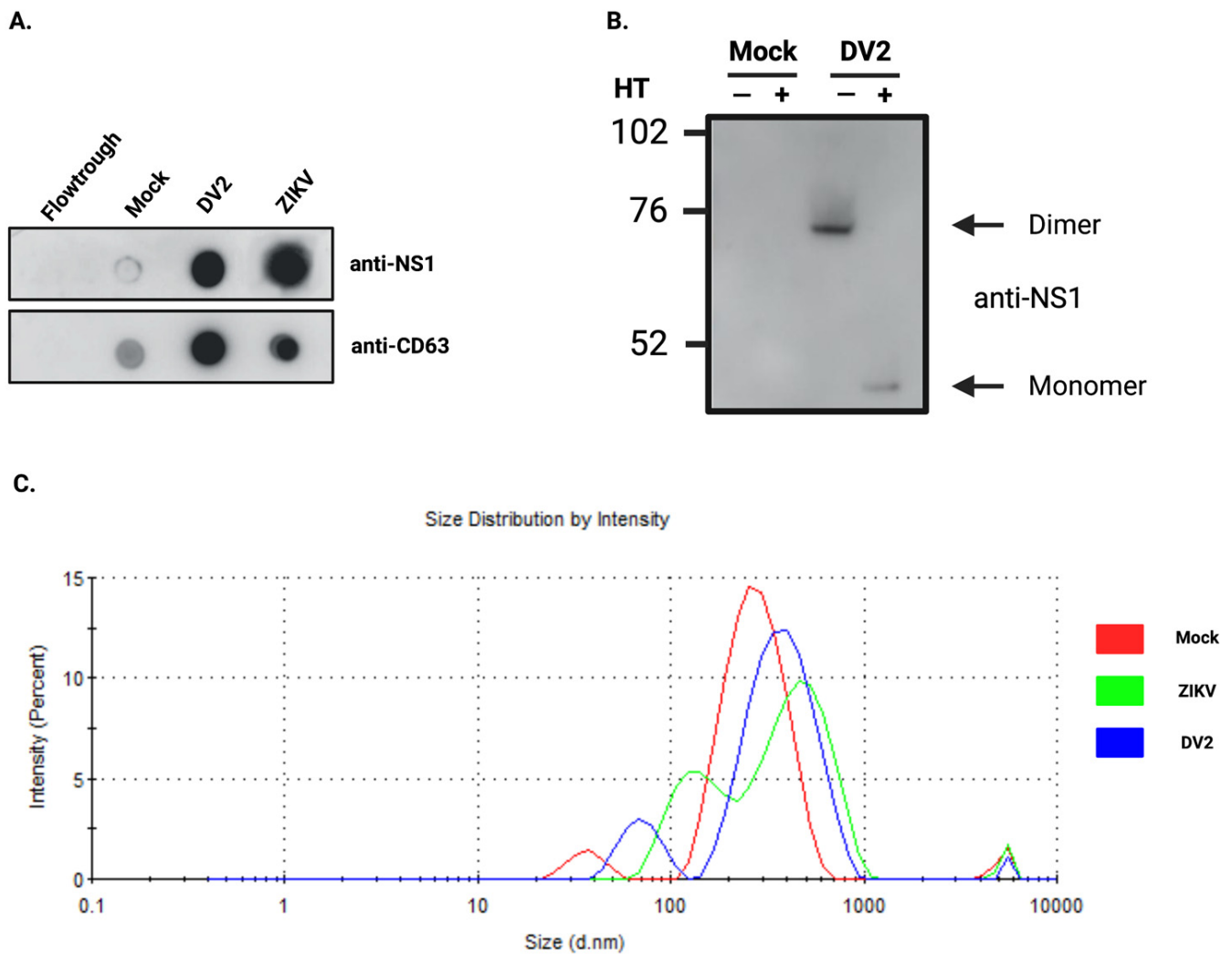


Figure 1. ZIKV and DENV2-infected A549 cells produce exosome-like particles associated with NS1 protein. (A) The NS1 protein of both ZIKV and DENV2 is found associated with the exosomal fraction obtained from the cell culture supernatants (CCS) of A549 infected cells. The tetraspanin CD63 detected on the dot blot of exosomal fractions provides insight into the quantity of exosomes extracted. (B) Western blot analysis of the exosome fraction, heated (HT) (+) or not (−), produced by DENV2 infected cells, show the presence of NS1 in dimeric form. A unique band with an apparent mass of ~48 kDa is observed after heating (+). (C) DLS analysis of exosomes produced by A549 cells during ZIKV (green) or DENV2 (blue) infection. On the y axis, the intensity gives the proportions of the different vesicle populations, depending on their size on the x axis. Both DENV2 and ZIKV infections appear to slightly reshape the distribution of vesicles.

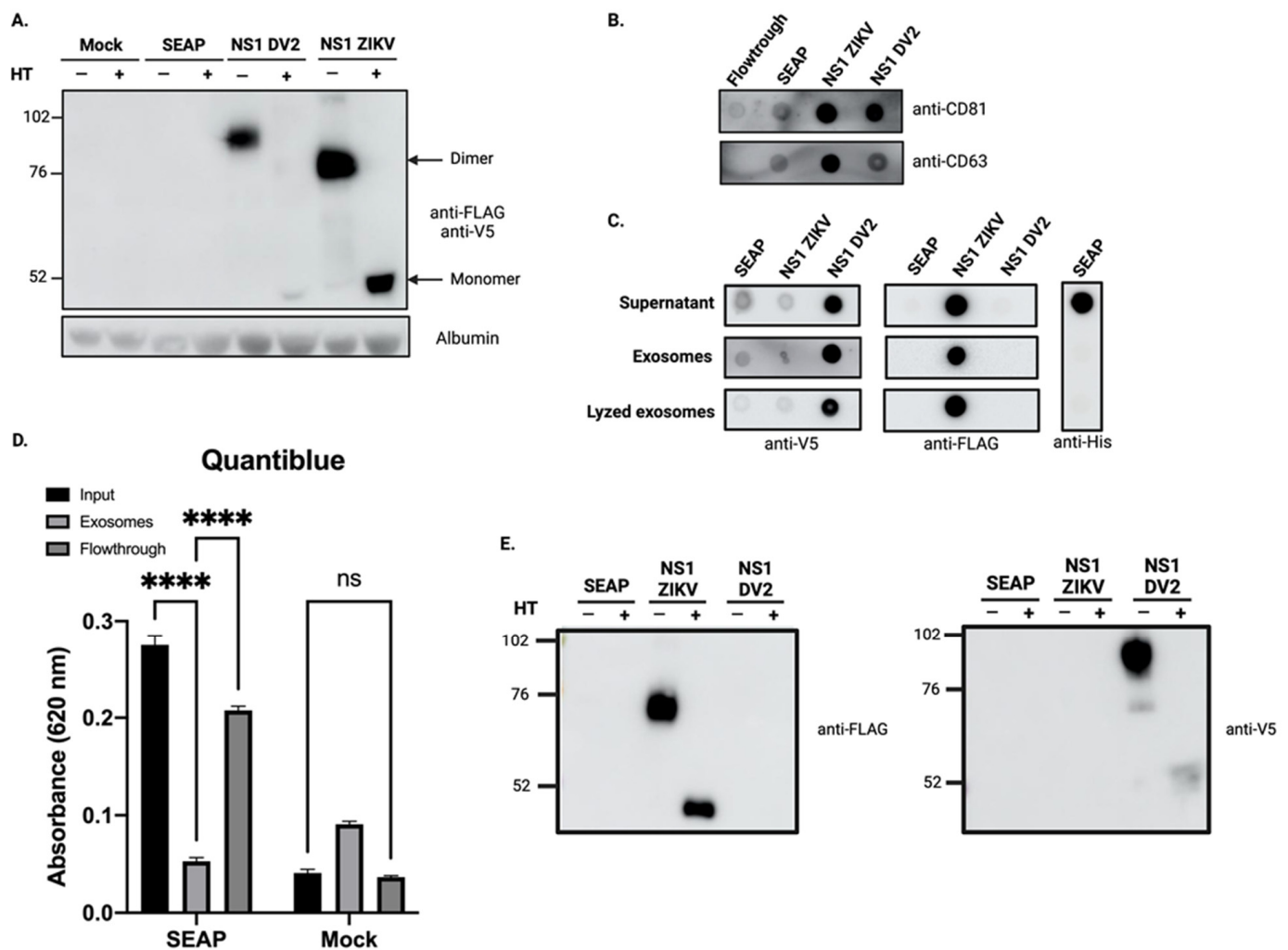


Figure 2. The overexpressed ZIKV-NS1^{FLAG-tag} and DENV2-NS1^{V5-tag} co-elute with exosome-like particles. (A) The recombinant ZIKV-NS1^{FLAG-tag} and DENV2-NS1^{V5-tag}, overexpressed in stable HEK cell lines, are present in the CCS, mainly as dimers. (B) The tetraspanins CD81 and CD63 are immunodetected in the exosome fractions of CCS from cells expressing the different secreted recombinant proteins. (C) When detecting the recombinant proteins in the CCS and exosomal fractions, only the NS1 proteins were detected in the exosomal fractions, and a similar signal was obtained whether or not the vesicles had been lysed. (D) SEAP activity was estimated by quantiblot assay. CCS and the flowthrough remaining from the exosome extraction, but not purified exosomes, exhibited SEAP activity. Ordinary one-way ANOVA test was performed using GraphPad Prism **** $p < 0.0001$, ns (not significant) (E) Western blot analysis of exosome protein extracts shows that ZIKV-NS1^{FLAG-tag} and DENV2-NS1^{V5-tag} are found associated with exosomes in their dimeric form.

3.3. The Overexpressed ZIKV-NS1^{FLAG-tag} Protein Localizes to the Surface of Exosomes

To demonstrate the possible interaction between exosomes and NS1, we proceeded to isolate EVs through several approaches and for this, we worked with the HEK293 cell line stably expressing ZIKV-NS1^{FLAG-tag}. First, we prepared EVs fractions by combining ultrafiltration and size exclusion chromatography (SEC) techniques. The first step of ultrafiltration and concentration was carried out on the CCS of HEK293-NS1, resulting in the presence of ZIKV-NS1^{FLAG-tag} protein in the >100 kDa fraction (Figure 3A). The >100 kDa fraction was then submitted to size exclusion chromatography. Based on preliminary assays, we decided to focus on the 13 mL to 15 mL fractions. These fractions were revealed in dot blot showing a potent signal for CD81 (Figure 3B). The presence of ZIKV-NS1^{FLAG-tag} in the 13 mL to 15 mL fractions was also investigated. Of note, using FLAG-tag directed antibodies,

we showed the presence of NS1 in the exosome-like fraction of HEK293-NS1, while no signal was found in the exosome-like fraction of HEK293-SEAP (Figure 3B). Finally, a third method of collecting extracellular vesicles, based on polyethylene glycol precipitation, was applied. The exosome enrichment of the resulting pellet and the combined presence of ZIKV-NS1^{FLAG-tag} were confirmed (Figure 3C). Altogether, these results suggest a co-elution of ZIKV-NS1^{FLAG-tag} protein with exosome-like particles that were obtained by several different methods and support the hypothesis of an interaction between NS1 and exosomes.

Table 2. Overexpression of ZIKV and DENV2 NS1 lead to an increase in exosomes size.

Sample	Z-Average (d.nm)	Standard Deviation	p-Value (vs.mock)
Mock	123.4	8.916	—
SEAP	119.5	3.627	ns
ZIKV NS1 ^{FLAG-Tag}	183.7	2.970	0.0001
DENV2 NS1 ^{FLAG-Tag}	209.3	4.382	0.0001

At this point, we have been able to show that ZIKV-NS1^{FLAG-tag} overexpression results in detecting NS1 protein with the exosome-like EVs produced by the cells. The question that arises is how NS1 is associated with these EVs. In order to test whether NS1 is found on the surface of exosomes we performed an ELISA capture assay using anti-CD81 antibodies. Then, HEK293-ZIKV-NS1^{FLAG-tag} CCS was incubated on CD81 coated plates and ZIKV-NS1^{FLAG-tag} protein was detected with an anti-FLAG antibody. As shown in Figure 3D, a significant difference in absorbance was observed between CCS of the HEK293-NS1 and control HEK293. This indicates that NS1 protein is detectable and therefore present on the surface of exosomes. At last, DLS analysis of the fractions revealed that overexpression of ZIKV-NS1^{FLAG-tag}, as well as DENV2-NS1^{V5-tag}, produced an increase in the average size of the vesicles detected (Figure 3E and Table 2). Although the size ranges of EVs produced by HEK293 are different from those of A549, it can be noticed that there is an increase upon NS1 overexpression and secretion, as with ZIKV or DENV2 infected cells (Figure 1). It could therefore be assumed that the association of NS1 with EVs is likely to alter their characteristics and potentially their behaviors.

3.4. The Soluble NS1 Proteins from ZIKV or DENV2 Are Able to Associate with Vesicles Present in the Extracellular Compartment

Our above data demonstrates an association of NS1 with exosome-like vesicles following infection with ZIKV or DENV2, as well as upon overexpression of the two recombinant NS1 proteins. At this stage, however, it must be ensured that this association is not the result of a fractionation bias and that NS1 is not simply a contaminant. Numerous studies show that no matter which extraction method is used, none can completely exclude contaminants that can co-elute with exosomes. Certain protein contents may be important, especially when concentrating body fluids by ultrafiltration [62]. To rule out the possibility that the NS1 protein is co-eluting with exosomes without being associated with them, we inhibited exosome biogenesis by using GW4869. Since GW4869 is known to inhibit the viral cycle and, subsequently, the secretion of NS1 [63,64], we chose the stable HEK293 cells expressing ZIKV-NS1^{FLAG-tag} for the functional test of exosome biogenesis inhibition. Cells were treated or not with GW4869 at 10 μ M for 16 h, and exosome extraction was proceeded using the Exoeasy Maxi kit[®]. To verify that incubation with GW4869 results in a decrease in exosome production, a dot blot was performed on CCS of HEK293 cells expressing ZIKV-NS1^{FLAG-tag}. The CD63 signal was found to be significantly diminished, confirming a reduced quantity of exosomes in the presence of the inhibitor (Supplemental Figure S2). If we examine the signal produced when detecting NS1 in the exosomal fraction of GW4869-treated cells, we find that it is reduced by almost half compared to the signal obtained with untreated cells (Figure 4A). The reduction in NS1 detection is indeed related to the reduction of exosomes extracted in the presence of the inhibitor.

Therefore, the NS1 protein detected is not the resulting product of a contamination but a protein that is associated with exosomes and behaves accordingly.

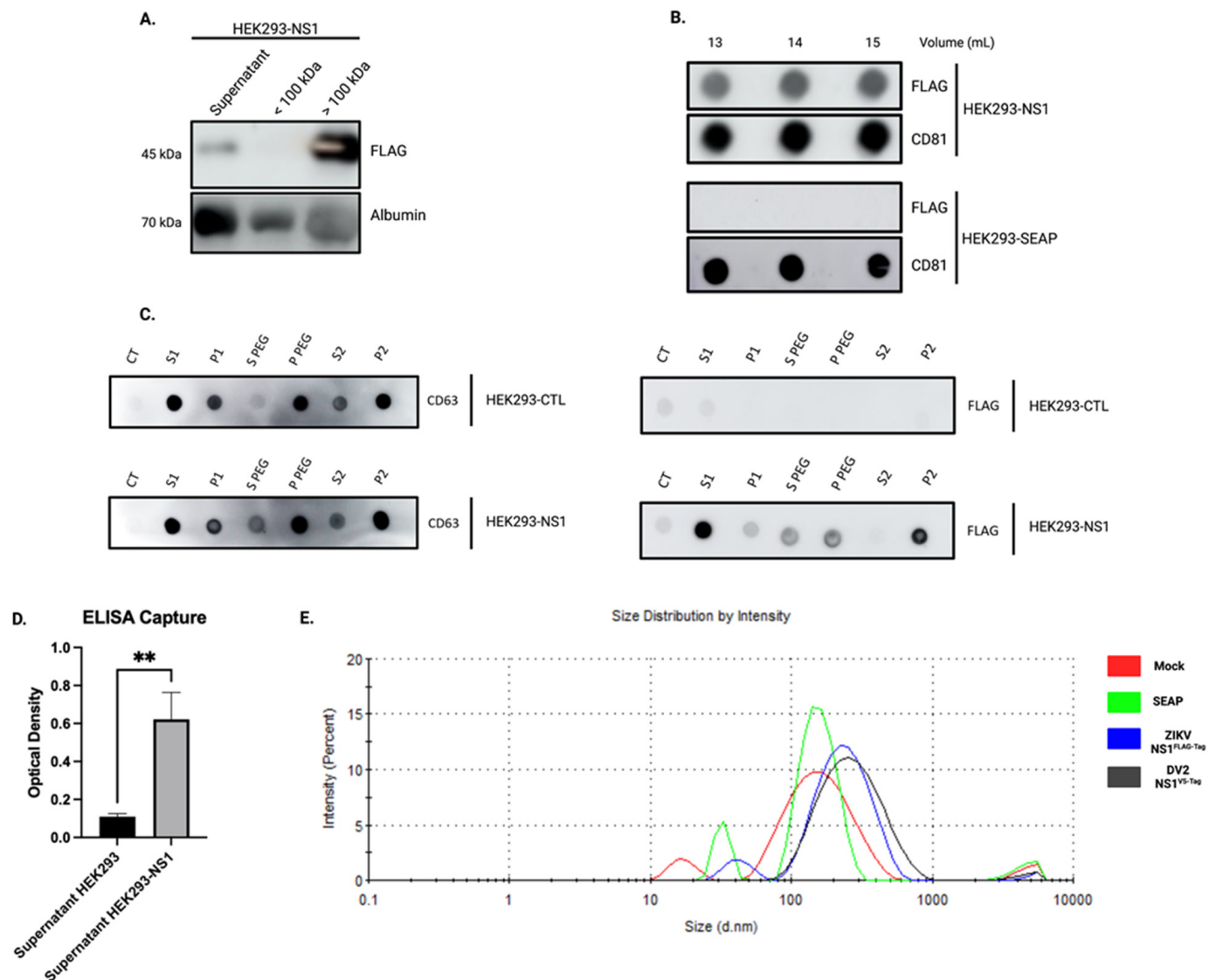


Figure 3. ZIKV-NS1^{FLAG}-tag is present in the exosome fraction. (A) Western blot analysis of HEK293-NS1 supernatant following ultrafiltration. Mouse anti-FLAG antibody was used to detect ZIKV-NS1^{FLAG}-tag, while the detection of albumin served as protein loading control. (B) Dot blot analysis of putative exosome fractions. After the ultrafiltration step, size exclusion chromatography was carried out on the >100 kDa fraction. Detection of ZIKV-NS1^{FLAG}-tag was achieved using a mouse anti-FLAG antibody, whereas CD81 was chosen as a marker for exosomes. (C) CCS containing CD63-positive EVs and secreted ZIKV-NS1^{FLAG}-tag (S1) were treated with PEG and centrifuged to obtain a pellet enriched in EVs. CD63 was found in the first pellet (P PEG) and after the second ultracentrifugation step (P2), validating the enrichment of exosomes which were also found associated with ZIKV-NS1^{FLAG}-tag. (D) ELISA capture of the exosomes in the supernatant of HEK293-ZIKV-NS1^{FLAG}-tag versus control. Exosomes were captured by an anti-CD81 antibody coated on Maxisorp® plate. NS1^{FLAG}-tag protein was detected using a mouse anti-FLAG antibody. Ordinary one-way ANOVA test was performed using GraphPad Prism, ** $p < 0.001$. (E) DLS analysis of the exosomal fractions with the proportion of vesicles by size graph and the corresponding z-average-table (Table 2).

We then aimed to determine whether the formation of vesicles-NS1 conjugates relates to intracellular exosome biogenesis or/and the ability of flavivirus NS1 to associate with lipid nanoparticles. Consequently, CCS samples from HEK293 cells grown in panserin were filtered using a centrifuge concentrator with a 100 kDa cutoff, and the concentrated EV-containing CCS were supplemented with 100 ng·mL⁻¹ recombinant ZIKV-NS1^{HIS-tag} or DENV2-NS1^{HIS-tag} proteins, the concentrations consistent with known flavivirus NS1 antigenemia. After 30 min or 4 h of incubation, extraction of EVs by the PEG precipitation technique was performed as described in the previous section. Dot blot analysis of samples identified free and EV-NS1 conjugates (Figure 4B). The formation of EV-NS1 conjugates was observed for ZIKV-NS1^{HIS-tag} (immunodetected with the anti-His antibody), and DENV2-NS1^{HIS-tag} (immunodetected with the NS1 antibody). Such results suggest that soluble NS1 can interact extemporaneously with EV surface.

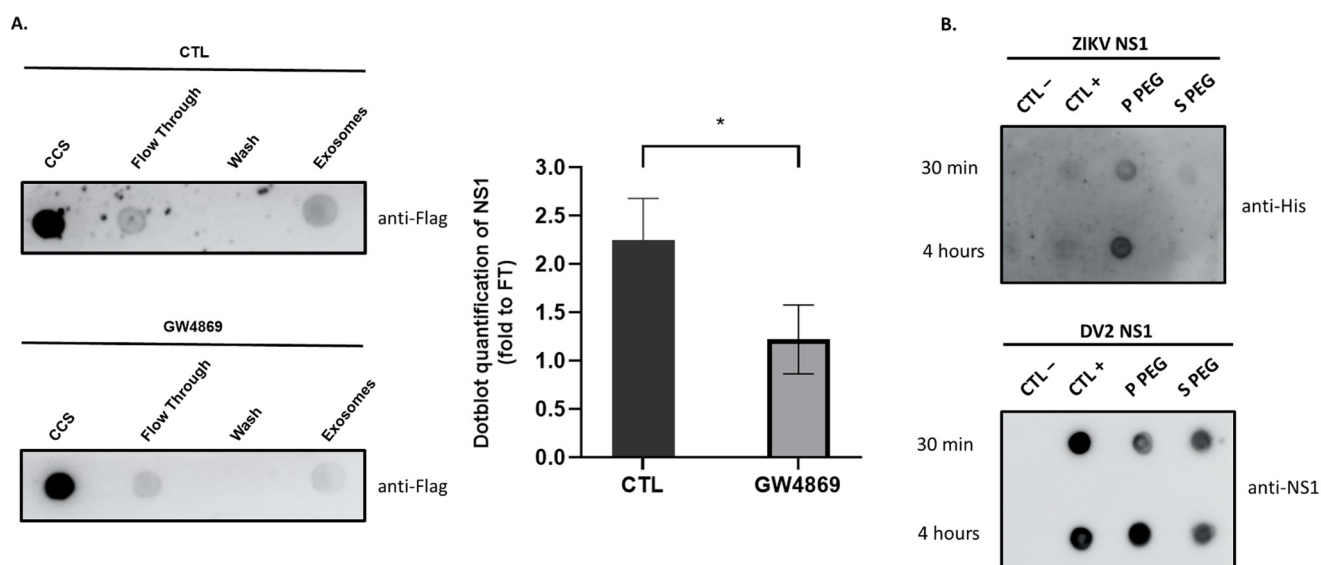


Figure 4. ZIKV and DV2 NS1 recombinant proteins bind to extracellular vesicles. **(A)** HEK 293 cells expressing ZIKV-NS1^{Flag-tag} protein were treated or not with GW4869 at 10 μ M for 16 h in order to inhibit exosome's biogenesis. The cell culture supernatant (CCS) was collected for exosomes extraction using the Exoeasy kit. A dot blot was performed using anti-Flag and then quantified using imageJ. The flow through (FT) is the remaining part of the first exosome extraction step, and the wash is the second flow through, considered as a negative control. The quantity of NS1 associated with exosomes was reduced when cells were treated with GW4869, thus eliminating the co-elution bias of NS1 protein with exosomes. Unpaired t-test was performed using GraphPad Prism, * $p < 0.05$. **(B)** CCS of HEK was collected 48 h post-plating and incubated with ZIKV-NS1^{HIS-tag} or DENV2-NS1^{HIS-tag} for 30 min and 4 h. CCS was then proceeded to PEG exosome precipitation. The negative control (CTL−) corresponds to panserin. The positive control (CTL+) corresponds to 0.2 ng of NS1 solubilized in panserin. Dot blots were performed using anti-His and anti-NS1 antibodies to detect ZIKV and DV2 NS1 proteins, respectively. NS1 of ZIKV and DV2 were found associated with EVs as early as 30 min post-incubation.

4. Discussion

The data on the involvement of extracellular vesicles, and in particular exosomes in infectious processes, remain limited, although are receiving increasing attention. The release of these vesicles from infected cells seems to be part of the defense mechanisms, particularly important in signaling to the immune system. The research community's concern in these processes has revealed that many viruses use or hijack these pathways to transport some of their components, thus diversifying their modes of propagation and pathological effects. However, little is known about the exosomes produced in the case of DENV and ZIKV infection. Although the clinical patterns and development of disease differ between DENV and ZIKV infections, a functional alteration of the endothelial and epithelial barriers is the most prominent mechanism proposed to explain the characteristics of both infections. Effects linked to similar mechanisms of action of the two NS1 viral proteins are the most likely since this toxin is found circulating in both cases. Thus, the pro-inflammatory and barrier-damaging activity of DENV-NS1, as well as ZIKV-NS1, has been extensively documented [65,66].

In this study, we were, therefore, able to show that *in vitro* cell infection with ZIKV, as with DENV, results in the production of “exosome-like” extracellular vesicles. These exosomes had the hallmark presence of the classical markers CD63 and CD81, and were characterized by the associated presence of the viral protein NS1 (Figure 1). By obtaining HEK293 cell lines stably expressing and secreting a recombinant ZIKV-NS1^{FLAG-tag} or DENV2-NS1^{V5-tag}, we were able to show that there was indeed an interaction of NS1, detected in its dimeric form, with exosome-like EVs (Figures 2 and 4A). Then, we were able to state that dimers of NS1 were located on the surface of vesicles, as shown by ELISA capture assay (Figure 3). Finally, incubation of cell supernatant with a soluble recombinant NS1 protein from both DENV2 and ZIKV revealed that NS1 was subsequently found in the exosome fraction (Figure 4). This suggests that in addition to the hexameric form described as the form circulating in biological fluids, NS1 is actually able to take a new transport route through dimer association with EVs. Finally, when analyzing the EVs profiles in DLS, infection and interaction with NS1 appear to be able to reshape the distribution and the size of the vesicles (Figures 1 and 3).

Exosomes released by cells through their secretory pathways compose the pool of small extracellular vesicles, which can be distinguished from other EVs by the presence of tetraspanins. They have established vehicles for conveying many types of chemical mediators between cells [35]. However, the exploitation of exosome communication pathways by viruses for their own benefit is a recent discovery [44]. Surprisingly, there are only a few data available on EVs produced during DENV infection of human cells, although several studies, which mainly focus on cellular factors, report altered mRNA, miRNA and protein content related to immune responses [49,67,68]. Thus, Mishra et al. report that both DENV infection and NS1 overexpression induce a high loading of exosomes with a cellular miRNA (miR-148) known to exert immunosuppressive activity [69]. These EVs, internalized by human microglial cells, would modulate neuroinflammation. The protective or contributory role of EVs in pathology has also been explored in the case of ZIKV infection, and available data has been extensively reviewed by Caobi et al. and Reyes-Ruiz et al. [70,71]. Again, several studies reported in these reviews reveal that EVs, especially those produced during the passage of the virus by the arthropod vector, could explain certain responses of human receptor cells and participate in endothelial vascular cell damage. EVs could also facilitate virus cell-to-cell transmission [72]. The recent work of Fikatas et al. provides crucial information on the role that EVs could play in modifying the integrity of the blood–brain barrier [51]. They show the ability of EVs to incorporate and transfer ZIKV RNA, NS1 and envelope protein to several recipient cells. They also show the ability of these EVs to disrupt the structure of human brain microvascular endothelial (hcMEC/D3) cell junctions.

With our findings, we now provide important new information, which is that EVs are coated with NS1. This raises questions about the impact that this viral toxin, present on the surface of exosomes, may have on communication between cells. Would it alter exosome tropism and uptake? Would it direct exosomes more specifically towards the endothelial surface, depending on the structure of the NS1 exposed [73]? Could this mode of transport stabilize the protein and allow it to circulate more sustainably in the body? These are all questions that will need to be clarified in the future.

Our study also revealed that the association of NS1 with EVs is more likely to occur in the extracellular environment rather than during the intracellular exosome biogenesis pathway, although such an early association cannot be totally excluded. We were indeed able to show that soluble or secreted dimeric proteins have the capacity to interact with the vesicles' surface. This interaction would occur in all biological fluids during the acute phase of infection when the concentration of blood-circulating NS1 is maximal. This ability to interact with membrane surfaces and lipids was not entirely a surprise [74]. It has also been shown that NS1 of ZIKV has the ability to interact with endoplasmic reticulum membranes, as well as with liposomes that are remodeled by this interaction [75]. In addition, NS1 from dengue virus was shown to dock onto high-density lipoproteins through both protein-protein and lipid-protein interactions [76].

In light of these data, we propose the use of exosomes as a vector to improve NS1 delivery and presentation to the immune system. Exosomes are already used for viral antigenic vectorization, with several vaccines in preclinical and clinical phases [77,78]. Due to the ability of overexpressed ZIKV-NS1 and DENV2-NS1 proteins to be targeted to exosomes, our finding illustrates the possibility of using exosomes as a platform for NS1 presentation. To date, no vaccine against ZIKV has been commercialized and there is much uncertainty about the use of available dengue vaccines. Most of the vaccine strategies against flaviviruses are based on targeting the envelope (E) protein, because of its ability to induce preventive humoral and cell-mediated immune responses [79]. For instance, Dengvaxia[®], the only licensed dengue vaccine currently commercialized, is a live-attenuated tetravalent dengue vaccine that contains DENV E and prM proteins from the four serotypes, in a yellow fever 17D backbone. One possible reason for the incomplete protection of this vaccine is a lack of T-cell immunity against non-structural proteins. Interestingly, a vaccine strategy targeting NS1 instead shows encouraging positive effects and prevents vascular permeability and hemorrhagic forms of the disease [80,81]. In addition, human antibodies targeting ZIKV-NS1 protect against disease development in a mouse model [82]. Thus, recombinant ZIKV-NS1 and DENV2-NS1 proteins would be considered as targets of choice for vaccine development [81,83]. Thanks to our work, we have available cell lines that stably overexpress and secrete these two NS1s. This makes it possible to use them for vaccine purposes. Moreover, the NS1 addressed on the surface of exosomes makes them an additional tool for a vaccine strategy aimed at an optimal presentation of the antigen. However, the safety of such a device will obviously have to be ensured, particularly if it is shown that the vectoring of NS1 by EVs potentiates its deleterious activity on endothelial barriers. All these points will need to be investigated in the future.

5. Conclusions

In conclusion, we demonstrated that NS1 secreted into the extracellular medium, following in vitro infection with DENV2 or ZIKV, or under conditions of overexpression and/or extemporaneous addition to the cell culture supernatant, led to an association of NS1 dimers on the surface of extracellular vesicles. This observation leads us to hypothesize that NS1 can be conveyed to privileged target cells and thereby act on infectious and pathological processes. This mode of transport could give the protein great stability in biological fluids. Finally, this addressing at the surface of exosomes could be used for antigen presentation in vaccine strategies targeting NS1 (Figure 5).

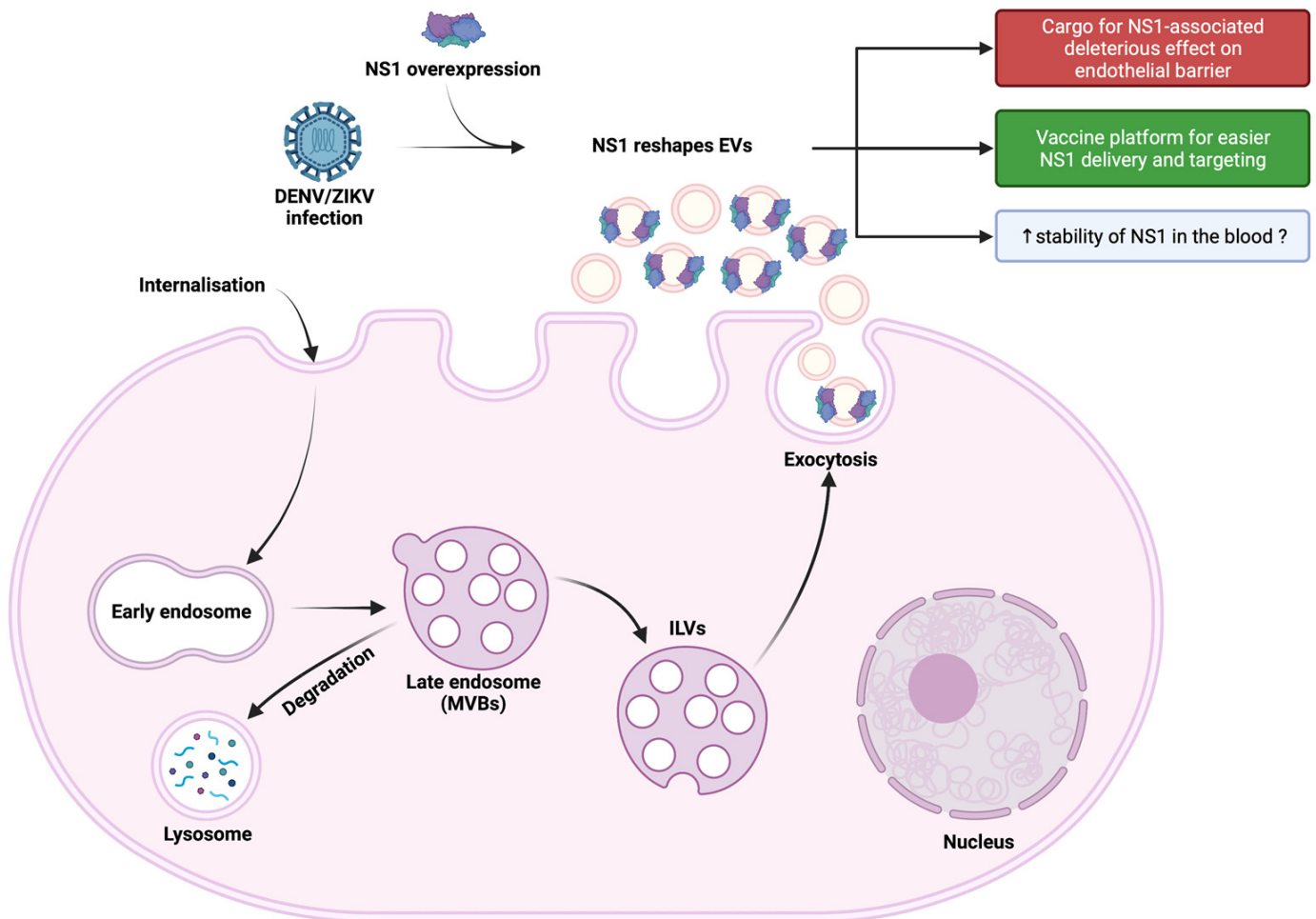


Figure 5. Graphical overview of the association of ZIKV and DENV NS1 proteins with exosomes.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15020364/s1>, Figure S1: Infection with both zika and dengue viruses was verified by flow cytometry. Figure S2: GW4869 inhibits exosome's biogenesis.

Author Contributions: Conceptualization, W.V. and P.K.-T.; methodology and experiments D.E.S., G.L., A.L., J.M., L.G. and M.H.; contribution to new reagents/analytic tools S.R., F.B. and B.V.; formal analysis, D.E.S., G.L., A.L., W.V. and P.K.-T.; resources, M.R., J.-J.H., O.M., P.M. and P.D.; writing—original draft preparation, D.E.S., G.L., A.L., W.V. and P.K.-T.; writing—review and editing, P.K.-T.; supervision, W.V. and P.K.-T.; funding acquisition, J.-J.H., P.D. and P.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the European Regional development Fund (RUNDENG 20201640-00222937), by the Federation BioST from Reunion Island University (SEVEXDENG project) and by the ZIKAlert project (European Union-Reunion program under grant agreement n° SYNERGY: RE0001902). D.E.S., G.L., F.B. and S.R. have Ph.D. degree scholarships from Reunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIREC/2021-1115, DIREC/2021-0161, DIREC/20210155 and D2019/21320 from Région Réunion Council, respectively.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this paper and Supplementary Materials.

Acknowledgments: We thank the members of PIMIT and DÉTROIT laboratories for the helpful discussions. Figure 5 was created with Biorender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

CCS	Cell culture supernatant
DLS	Dynamic light scattering
DENV2	Dengue virus type 2
EVs	Extracellular vesicles
ILVs	Intraluminal vesicles
MVBs	Multivesicular bodies
NS1	Non structural protein 1
PEG	Polyethylene glycol
SEAP	Serum alkaline phosphatase
ZIKV	Zika virus

References

1. Gubler, D.J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems. *Arch. Med. Res.* **2002**, *33*, 330–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Iwamura, T.; Guzman-Holst, A.; Murray, K.A. Accelerating Invasion Potential of Disease Vector *Aedes Aegypti* under Climate Change. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2130. [[CrossRef](#)]
3. Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and Future Arboviral Threats. *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 328–345. [[CrossRef](#)]
4. Messina, J.P.; Brady, O.J.; Golding, N.; Kraemer, M.U.G.; Wint, G.R.W.; Ray, S.E.; Pigott, D.M.; Shearer, F.M.; Johnson, K.; Earl, L.; et al. The Current and Future Global Distribution and Population at Risk of Dengue. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1508–1515. [[CrossRef](#)]
5. Cattarino, L.; Rodriguez-Barraquer, I.; Imai, N.; Cummings, D.A.T.; Ferguson, N.M. Mapping Global Variation in Dengue Transmission Intensity. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12*, eaax4144. [[CrossRef](#)]
6. Wilder-Smith, A.; Ooi, E.-E.; Horstick, O.; Wills, B. Dengue. *Lancet* **2019**, *393*, 350–363. [[CrossRef](#)]
7. Sharp, T.M.; Anderson, K.B.; Katzelnick, L.C.; Clapham, H.; Johansson, M.A.; Morrison, A.C.; Harris, E.; Paz-Bailey, G.; Waterman, S.H. Knowledge Gaps in the Epidemiology of Severe Dengue Impede Vaccine Evaluation. *Lancet Infect. Dis.* **2022**, *22*, e42–e51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ahmad, Z.; Poh, C.L. The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. *Int. J. Med. Sci.* **2019**, *16*, 355–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Saiz, J.-C.; Vázquez-Calvo, Á.; Blázquez, A.B.; Merino-Ramos, T.; Escribano-Romero, E.; Martín-Acebes, M.A. Zika Virus: The Latest Newcomer. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 496. [\[CrossRef\]](#)
10. Musso, D.; Gubler, D.J. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 487–524. [\[CrossRef\]](#)
11. Muñoz, L.; Barreras, P.; Pardo, C. Zika Virus–Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain–Barré Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. *Semin. Reprod. Med.* **2016**, *34*, 273–279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Krauer, F.; Riesen, M.; Reveiz, L.; Oladapo, O.T.; Martínez-Vega, R.; Porgo, T.V.; Haefliger, A.; Broutet, N.J.; Low, N.; WHO Zika Causality Working Group. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med.* **2017**, *14*, e1002203. [\[CrossRef\]](#)
13. Freitas, D.A.; Souza-Santos, R.; Carvalho, L.M.A.; Barros, W.B.; Neves, L.M.; Brasil, P.; Wakimoto, M.D. Congenital Zika Syndrome: A Systematic Review. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0242367. [\[CrossRef\]](#)
14. Musso, D.; Roche, C.; Robin, E.; Nhan, T.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.-M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 359–361. [\[CrossRef\]](#)
15. Edeling, M.A.; Diamond, M.S.; Fremont, D.H. Structural Basis of Flavivirus NS1 Assembly and Antibody Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4285–4290. [\[CrossRef\]](#)
16. Zhang, H.; Li, W.; Wang, J.; Peng, H.; Che, X.; Chen, X.; Zhou, Y. NS1-Based Tests with Diagnostic Utility for Confirming Dengue Infection: A Meta-Analysis. *Int. J. Infect. Dis.* **2014**, *26*, 57–66. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Delfin-Riela, T.; Rossotti, M.; Alvez-Rosado, R.; Leizagoyen, C.; González-Sapienza, G. Highly Sensitive Detection of Zika Virus Nonstructural Protein 1 in Serum Samples by a Two-Site Nanobody ELISA. *Biomolecules* **2020**, *10*, 1652. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Dussart, P.; Petit, L.; Labeau, B.; Bremand, L.; Leduc, A.; Moua, D.; Matheus, S.; Baril, L. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2008**, *2*, e280. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Lee, K.H.; Zeng, H. Aptamer-Based ELISA Assay for Highly Specific and Sensitive Detection of Zika NS1 Protein. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12743–12748. [\[CrossRef\]](#)
20. Song, H.; Qi, J.; Haywood, J.; Shi, Y.; Gao, G.F. Zika Virus NS1 Structure Reveals Diversity of Electrostatic Surfaces among Flaviviruses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 456–458. [\[CrossRef\]](#)
21. Scaturro, P.; Cortese, M.; Chatel-Chaix, L.; Fischl, W.; Bartenschlager, R. Dengue Virus Non-Structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1005277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Glasner, D.R.; Puerta-Guardo, H.; Beatty, P.R.; Harris, E. The Good, the Bad, and the Shocking: The Multiple Roles of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 in Protection and Pathogenesis. *Annu. Rev. Virol.* **2018**, *5*, 227–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lee, M.F.; Voon, G.Z.; Lim, H.X.; Chua, M.L.; Poh, C.L. Innate and Adaptive Immune Evasion by Dengue Virus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1004608. [\[CrossRef\]](#)
24. Avirutnan, P.; Fuchs, A.; Hauhart, R.E.; Somnuk, P.; Youn, S.; Diamond, M.S.; Atkinson, J.P. Antagonism of the Complement Component C4 by Flavivirus Nonstructural Protein NS1. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 793–806. [\[CrossRef\]](#)
25. Chen, H.-R.; Chuang, Y.-C.; Lin, Y.-S.; Liu, H.-S.; Liu, C.-C.; Perng, G.-C.; Yeh, T.-M. Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Induces Vascular Leakage through Macrophage Migration Inhibitory Factor and Autophagy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004828. [\[CrossRef\]](#)
26. Rastogi, M.; Singh, S.K. Zika Virus NS1 Affects the Junctional Integrity of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Biochimie* **2020**, *176*, 52–61. [\[CrossRef\]](#)
27. Puerta-Guardo, H.; Glasner, D.R.; Harris, E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005738. [\[CrossRef\]](#)
28. Glasner, D.R.; Ratnasiri, K.; Puerta-Guardo, H.; Espinosa, D.A.; Beatty, P.R.; Harris, E. Dengue Virus NS1 Cytokine-Independent Vascular Leak Is Dependent on Endothelial Glycocalyx Components. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006673. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Bhardwaj, U.; Singh, S.K. Zika Virus NS1 Suppresses VE-Cadherin and Claudin-5 via Hsa-MiR-101-3p in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Mol. Neurobiol.* **2021**, *58*, 6290–6303. [\[CrossRef\]](#)
30. Doyle, L.; Wang, M. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* **2019**, *8*, 727. [\[CrossRef\]](#)
31. Deatherage, B.L.; Cookson, B.T. Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: A Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect Immun.* **2012**, *80*, 1948–1957. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Mathieu, M.; Martin-Jaular, L.; Lavieu, G.; Théry, C. Specificities of Secretion and Uptake of Exosomes and Other Extracellular Vesicles for Cell-to-Cell Communication. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 9–17. [\[CrossRef\]](#)
33. Li, S.; Lin, Z.; Jiang, X.; Yu, X. Exosomal Cargo-Loading and Synthetic Exosome-Mimics as Potential Therapeutic Tools. *Acta Pharmacol. Sin.* **2018**, *39*, 542–551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

34. Mashouri, L.; Yousefi, H.; Aref, A.R.; Ahadi, A.; Molaei, F.; Alahari, S.K. Exosomes: Composition, Biogenesis, and Mechanisms in Cancer Metastasis and Drug Resistance. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 75. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kalluri, R.; LeBleu, V.S. The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. *Science* **2020**, *367*, eaau6977. [\[CrossRef\]](#)
36. Kalluri, R. The Biology and Function of Exosomes in Cancer. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1208–1215. [\[CrossRef\]](#)
37. Rajagopal, C.; Harikumar, K.B. The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 66. [\[CrossRef\]](#)
38. Quek, C.; Hill, A.F. The Role of Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 1178–1186. [\[CrossRef\]](#)
39. Zhang, Y.; Hu, Y.-W.; Zheng, L.; Wang, Q. Characteristics and Roles of Exosomes in Cardiovascular Disease. *DNA Cell Biol.* **2017**, *36*, 202–211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Deng, Z.; Poliakov, A.; Hardy, R.W.; Clements, R.; Liu, C.; Liu, Y.; Wang, J.; Xiang, X.; Zhang, S.; Zhuang, X.; et al. Adipose Tissue Exosome-Like Vesicles Mediate Activation of Macrophage-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* **2009**, *58*, 2498–2505. [\[CrossRef\]](#)
41. Castaño, C.; Kalko, S.; Novials, A.; Párrizas, M. Obesity-Associated Exosomal MiRNAs Modulate Glucose and Lipid Metabolism in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 12158–12163. [\[CrossRef\]](#)
42. Bang, C.; Batkai, S.; Dangwal, S.; Gupta, S.K.; Foinquinos, A.; Holzmann, A.; Just, A.; Remke, J.; Zimmer, K.; Zeug, A.; et al. Cardiac Fibroblast-Derived MicroRNA Passenger Strand-Enriched Exosomes Mediate Cardiomyocyte Hypertrophy. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 2136–2146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Brigstock, D.R. Extracellular Vesicles in Organ Fibrosis: Mechanisms, Therapies, and Diagnostics. *Cells* **2021**, *10*, 1596. [\[CrossRef\]](#)
44. Zhang, W.; Jiang, X.; Bao, J.; Wang, Y.; Liu, H.; Tang, L. Exosomes in Pathogen Infections: A Bridge to Deliver Molecules and Link Functions. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 90. [\[CrossRef\]](#)
45. Longatti, A.; Boyd, B.; Chisari, F.V. Virion-Independent Transfer of Replication-Competent Hepatitis C Virus RNA between Permissive Cells. *J. Virol.* **2015**, *89*, 2956–2961. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Ramakrishnaiah, V.; Thumann, C.; Fofana, I.; Habersetzer, F.; Pan, Q.; de Ruiter, P.E.; Willemsen, R.; Demmers, J.A.A.; Stalin Raj, V.; Jenster, G.; et al. Exosome-Mediated Transmission of Hepatitis C Virus between Human Hepatoma Huh7.5 Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 13109–13113. [\[CrossRef\]](#)
47. Masciopinto, F.; Giovani, C.; Campagnoli, S.; Galli-Stampino, L.; Colombatto, P.; Brunetto, M.; Yen, T.S.B.; Houghton, M.; Pileri, P.; Abrignani, S. Association of Hepatitis C Virus Envelope Proteins with Exosomes. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 2834–2842. [\[CrossRef\]](#)
48. Le, B.C.T.; Burassakarn, A.; Tongchai, P.; Ekalaksananan, T.; Aromseree, S.; Phanthanawiboon, S.; Polsan, Y.; Alexander, N.; Overgaard, H.J.; Pientong, C. Characterization and Involvement of Exosomes Originating from Chikungunya Virus-Infected Epithelial Cells in the Transmission of Infectious Viral Elements. *IJMS* **2022**, *23*, 12117. [\[CrossRef\]](#)
49. Mishra, R.; Lata, S.; Ali, A.; Banerjee, A.C. Dengue Haemorrhagic Fever: A Job Done via Exosomes? *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 1626–1635. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Perez-Toledo, M.; Beristain-Covarrubias, N. A New Player in the Game: Platelet-Derived Extracellular Vesicles in Dengue Hemorrhagic Fever. *Platelets* **2020**, *31*, 412–414. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Fikatas, A.; Dehairs, J.; Noppen, S.; Doijen, J.; Vanderhoydonc, F.; Meyen, E.; Swinnen, J.V.; Pannecouque, C.; Schols, D. Deciphering the Role of Extracellular Vesicles Derived from ZIKV-Infected HcMEC/D3 Cells on the Blood–Brain Barrier System. *Viruses* **2021**, *13*, 2363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Frumence, E.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; El-Kalamouni, C.; Nativel, B.; Rondeau, P.; Missé, D.; Gadea, G.; Viranaicken, W.; Desprès, P. The South Pacific Epidemic Strain of Zika Virus Replicates Efficiently in Human Epithelial A549 Cells Leading to IFN- β Production and Apoptosis Induction. *Virology* **2016**, *493*, 217–226. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Viranaicken, W.; Ndebo, A.; Bos, S.; Souque, P.; Gadea, G.; El-Kalamouni, C.; Krejbich-Trotot, P.; Charneau, P.; Desprès, P.; Roche, M. Recombinant Zika NS1 Protein Secreted from Vero Cells Is Efficient for Inducing Production of Immune Serum Directed against NS1 Dimer. *IJMS* **2017**, *19*, 38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Barash, S.; Wang, W.; Shi, Y. Human Secretory Signal Peptide Description by Hidden Markov Model and Generation of a Strong Artificial Signal Peptide for Secreted Protein Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*, 835–842. [\[CrossRef\]](#)
55. Croyal, M.; Tran, T.-T.-T.; Blanchard, R.H.; Le Bail, J.-C.; Villard, E.F.; Poirier, B.; Aguesse, A.; Billon-Crossouard, S.; Ramin-Mangata, S.; Blanchard, V.; et al. PCSK9 Inhibition with Alirocumab Reduces Lipoprotein(a) Levels in Nonhuman Primates by Lowering Apolipoprotein(a) Production Rate. *Clin. Sci.* **2018**, *132*, 1075–1083. [\[CrossRef\]](#)
56. Rider, M.A.; Hurwitz, S.N.; Meckes, D.G. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23978. [\[CrossRef\]](#)
57. Ramirez, M.I.; Amorim, M.G.; Gadelha, C.; Milic, I.; Welsh, J.A.; Freitas, V.M.; Nawaz, M.; Akbar, N.; Couch, Y.; Makin, L.; et al. Technical Challenges of Working with Extracellular Vesicles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 881–906. [\[CrossRef\]](#)
58. Lee, Y.-R.; Su, C.-Y.; Chow, N.-H.; Lai, W.-W.; Lei, H.-Y.; Chang, C.-L.; Chang, T.-Y.; Chen, S.-H.; Lin, Y.-S.; Yeh, T.-M.; et al. Dengue Viruses Can Infect Human Primary Lung Epithelia as Well as Lung Carcinoma Cells, and Can Also Induce the Secretion of IL-6 and RANTES. *Virus Res.* **2007**, *126*, 216–225. [\[CrossRef\]](#)

59. Reyes-Ruiz, J.M.; Osuna-Ramos, J.F.; De Jesús-González, L.A.; Hurtado-Monzón, A.M.; Farfan-Morales, C.N.; Cervantes-Salazar, M.; Bolaños, J.; Cigarroa-Mayorga, O.E.; Martín-Martínez, E.S.; Medina, F.; et al. Isolation and Characterization of Exosomes Released from Mosquito Cells Infected with Dengue Virus. *Virus Res.* **2019**, *266*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
60. Roldán, J.S.; Cassola, A.; Castillo, D.S. Optimization of Recombinant Zika Virus NS1 Protein Secretion from HEK293 Cells. *Biotechnol. Rep.* **2020**, *25*, e00434. [\[CrossRef\]](#)
61. Allonso, D.; da Silva Rosa, M.; Coelho, D.R.; da Costa, S.M.; Nogueira, R.M.R.; Bozza, F.A.; Santos, F.B.D.; de Barcelos Alves, A.M.; Mohana-Borges, R. Polyclonal Antibodies against Properly Folded Dengue Virus NS1 Protein Expressed in E. Coli Enable Sensitive and Early Dengue Diagnosis. *J. Virol. Methods* **2011**, *175*, 109–116. [\[CrossRef\]](#)
62. Benjamin-Davalos, S.; Koroleva, M.; Allen, C.L.; Ernstoff, M.S.; Shu, S.L. Co-Isolation of Cytokines and Exosomes: Implications for Immunomodulation Studies. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 638111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Huang, Y.; Li, Y.; Zhang, H.; Zhao, R.; Jing, R.; Xu, Y.; He, M.; Peer, J.; Kim, Y.C.; Luo, J.; et al. Zika Virus Propagation and Release in Human Fetal Astrocytes Can Be Suppressed by Neutral Sphingomyelinase-2 Inhibitor GW4869. *Cell Discov.* **2018**, *4*, 19. [\[CrossRef\]](#)
64. Streck, N.T.; Zhao, Y.; Sundstrom, J.M.; Buchkovich, N.J. Human Cytomegalovirus Utilizes Extracellular Vesicles To Enhance Virus Spread. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00609–20. [\[CrossRef\]](#)
65. Latanova, A.; Starodubova, E.; Karpov, V. Flaviviridae Nonstructural Proteins: The Role in Molecular Mechanisms of Triggering Inflammation. *Viruses* **2022**, *14*, 1808. [\[CrossRef\]](#)
66. Puerta-Guardo, H.; Glasner, D.R.; Espinosa, D.A.; Biering, S.B.; Patana, M.; Ratnasiri, K.; Wang, C.; Beatty, P.R.; Harris, E. Flavivirus NS1 Triggers Tissue-Specific Vascular Endothelial Dysfunction Reflecting Disease Tropism. *Cell Rep.* **2019**, *26*, 1598–1613.e8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. de T. Martins, S.; Kuczera, D.; Lötvall, J.; Bordignon, J.; Alves, L.R. Characterization of Dendritic Cell-Derived Extracellular Vesicles During Dengue Virus Infection. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1792. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Zhu, X.; He, Z.; Yuan, J.; Wen, W.; Huang, X.; Hu, Y.; Lin, C.; Pan, J.; Li, R.; Deng, H.; et al. IFITM3-Containing Exosome as a Novel Mediator for Anti-Viral Response in Dengue Virus Infection: Antiviral Effect of IFITM3 Mediated by Exosome. *Cell Microbiol.* **2015**, *17*, 105–118. [\[CrossRef\]](#)
69. Mishra, R.; Lahon, A.; Banerjee, A.C. Dengue Virus Degrades USP33–ATF3 Axis via Extracellular Vesicles to Activate Human Microglial Cells. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1787–1798. [\[CrossRef\]](#)
70. Caobi, A.; Nair, M.; Raymond, A.D. Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Viral Infections in Humans. *Viruses* **2020**, *12*, 1200. [\[CrossRef\]](#)
71. Reyes-Ruiz, J.M.; Osuna-Ramos, J.F.; De Jesús-González, L.A.; Palacios-Rápalo, S.N.; Cordero-Rivera, C.D.; Farfan-Morales, C.N.; Hurtado-Monzón, A.M.; Gallardo-Flores, C.E.; Alcaraz-Estrada, S.L.; Salas-Benito, J.S.; et al. The Regulation of Flavivirus Infection by Hijacking Exosome-Mediated Cell–Cell Communication: New Insights on Virus–Host Interactions. *Viruses* **2020**, *12*, 765. [\[CrossRef\]](#)
72. York, S.B.; Sun, L.; Cone, A.S.; Duke, L.C.; Cheerathodi, M.R.; Meckes, D.G. Zika Virus Hijacks Extracellular Vesicle Tetraspanin Pathways for Cell-to-Cell Transmission. *mSphere* **2021**, *6*, e00192–21. [\[CrossRef\]](#)
73. Lo, N.T.N.; Roodsari, S.Z.; Tin, N.L.; Wong, M.P.; Biering, S.B.; Harris, E. Molecular Determinants of Tissue Specificity of Flavivirus Nonstructural Protein 1 Interaction with Endothelial Cells. *J. Virol.* **2022**, *96*, e00661–22. [\[CrossRef\]](#)
74. Ci, Y.; Yang, Y.; Xu, C.; Qin, C.-F.; Shi, L. Electrostatic Interaction Between NS1 and Negatively Charged Lipids Contributes to Flavivirus Replication Organelles Formation. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 641059. [\[CrossRef\]](#)
75. Ci, Y.; Liu, Z.-Y.; Zhang, N.-N.; Niu, Y.; Yang, Y.; Xu, C.; Yang, W.; Qin, C.-F.; Shi, L. Zika NS1-Induced ER Remodeling Is Essential for Viral Replication. *J. Cell Biol.* **2020**, *219*, e201903062. [\[CrossRef\]](#)
76. Benfrid, S.; Park, K.; Dellarole, M.; Voss, J.E.; Tamietti, C.; Pehau-Arnaudet, G.; Raynal, B.; Brûlé, S.; England, P.; Zhang, X.; et al. Dengue Virus NS1 Protein Conveys Pro-inflammatory Signals by Docking onto High-density Lipoproteins. *EMBO Rep.* **2022**, *23*, e53600. [\[CrossRef\]](#)
77. Santos, P.; Almeida, F. Exosome-Based Vaccines: History, Current State, and Clinical Trials. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 711565. [\[CrossRef\]](#)
78. Tsai, S.J.; Atai, N.A.; Cacciottolo, M.; Nice, J.; Salehi, A.; Guo, C.; Sedgwick, A.; Kanagavelu, S.; Gould, S.J. Exosome-Mediated mRNA Delivery in Vivo Is Safe and Can Be Used to Induce SARS-CoV-2 Immunity. *J. Biol. Chem.* **2021**, *297*, 101266. [\[CrossRef\]](#)
79. Vigne, C.; Dupuy, M.; Richetin, A.; Guy, B.; Jackson, N.; Bonaparte, M.; Hu, B.; Saville, M.; Chansinghakul, D.; Noriega, F.; et al. Integrated Immunogenicity Analysis of a Tetravalent Dengue Vaccine up to 4 y after Vaccination. *Human Vaccines Immunother.* **2017**, *13*, 2004–2016. [\[CrossRef\]](#)
80. Beatty, P.R.; Puerta-Guardo, H.; Killingbeck, S.S.; Glasner, D.R.; Hopkins, K.; Harris, E. Dengue Virus NS1 Triggers Endothelial Permeability and Vascular Leak That Is Prevented by NS1 Vaccination. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 304ra141. [\[CrossRef\]](#)

81. Carpio, K.L.; Barrett, A.D.T. Flavivirus NS1 and Its Potential in Vaccine Development. *Vaccines* **2021**, *9*, 622. [[CrossRef](#)]
82. Bailey, M.J.; Duehr, J.; Dulin, H.; Broecker, F.; Brown, J.A.; Arumemi, F.O.; Bermúdez González, M.C.; Leyva-Grado, V.H.; Evans, M.J.; Simon, V.; et al. Human Antibodies Targeting Zika Virus NS1 Provide Protection against Disease in a Mouse Model. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4560. [[CrossRef](#)]
83. Lebeau, G.; Lagrave, A.; Ogire, E.; Grondin, L.; Seriacaroupin, S.; Moutoussamy, C.; Mavingui, P.; Hoarau, J.-J.; Roche, M.; Krejbich-Trotot, P.; et al. Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines* **2021**, *9*, 946. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Abstract

The beneficial properties of high-density lipoproteins (HDL) in the reduction of cardiovascular diseases are well recognized. Several clinical studies have shown that low plasma HDL levels are associated with the development of atherosclerosis and vascular complications. HDL exhibits several protective functions, such as the reverse cholesterol transport from peripheral tissues to the liver, as well as antioxidant and anti-inflammatory properties. The multiple protective functions of HDL appear to be carried out mainly by the lipoprotein's major protein component, apolipoprotein A-I (ApoA-I). HDL, via ApoA-I, are also natural nanoparticles with the ability to transport and vectorize numerous endogenous molecules such as alpha-1-antitrypsin (AAT), an enzyme with protective activity that can reduce the inflammatory processes involved in numerous vascular and respiratory pathologies. AAT inhibits the activity of proteases such as elastase, thereby reducing inflammation. All the protective functions of HDL, as well as their transport role, make these particles interesting nano-vectors for the development of new therapies.

The aim of my thesis is to produce HDLs enriched with AAT, and to characterize their structural and functional anti-inflammatory properties, in an *in vitro* cell culture model and *in vivo* mouse model. In addition, the nanoparticles produced have been used to explore novel routes of administration such as inhalation, a highly targeted route for the treatment of vascular or pulmonary pathologies.

To achieve these objectives, a recombinant ApoA-I (rApoA-I) was fused to a cleavable histidine tag in the bacterial strain *Clear coli*. After cleavage of the tag and purification by affinity chromatography, rApoA-I was characterized by SDS-PAGE electrophoresis and analyzed by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The rHDL were prepared following a protocol using sodium cholate dialysis by combining purified and characterized ApoA-I with phosphatidylcholine in a 1:75 molar ratio. Dynamic light scattering and electron microscopy techniques revealed that the nanoparticles obtained were about 7 nm in size and had a morphology similar to the natural pre- β -HDL. Functional characterization on endothelial (EA. hy926) and epithelial (A549) cells showed rapid internalization of rHDL while preserving cell viability. In addition, EA. hy926 incubated with rHDL showed a decrease in the expression of the cytokine IL-6 and the adhesion molecule ICAM-1, attesting the anti-inflammatory and endothelial protection capacity of nanoparticles.

In vivo, the bioavailability test performed on C57BL/6 mice revealed good uptake of rHDL nanoparticles by the lungs, 6 h after their administration by aerosolization.

Enrichment of nanoparticles with AAT showed that even in the presence of modest enrichment, rHDL exhibited significant anti-inflammatory and endothelium-protecting activities, as well as significant anti-elastase activity, *in vitro*.

In conclusion, my results showed that rHDL produced from recombinant ApoA-I exhibit protective effects. The homogeneous distribution of rHDL within the lungs and the absence of cytotoxicity suggest that they could be used to treat inflammatory lung diseases such as pulmonary emphysema. In addition, enrichment of rHDL with AAT showed that the enzyme's anti-elastase activity was preserved, a prerequisite for its anti-inflammatory role. Thus, the results of my thesis work provide important validation elements for the preparation and use of rHDL as nano-carriers for therapeutic compounds administered via the pulmonary route.

Keywords : HDL, lipoproteins, apolipoprotein A-I, nanoparticles, vectorization, alpha-1-antitrypsin, aerosolization, anti-inflammatory

Résumé

Les propriétés bénéfiques des lipoprotéines de haute densité (HDL) sont bien reconnues pour contrer les maladies cardiovasculaires. De nombreuses études cliniques montrent en effet qu'un faible taux plasmatique de HDL est associé à un développement accru de l'athérosclérose et des complications vasculaires associées. Les HDL présentent de nombreuses fonctions protectrices comme le transport inverse du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie mais également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Les fonctions protectrices multiples des HDL semblent portées par la protéine majeure, l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I). Les HDL, via leur ApoA-I, constituent de véritables nanoparticules naturelles ayant la capacité à transporter et vectoriser les molécules endogènes comme l'alpha-1-antitrypsine (AAT), une enzyme exerçant une activité protectrice pouvant réduire les processus inflammatoires impliqués dans de nombreuses pathologies vasculaires ou respiratoires. L'AAT exerce une inhibition de l'activité de protéases comme l'élastase, réduisant ainsi l'inflammation. L'ensemble des fonctions protectrices des HDL, ainsi que leur rôle de transport font d'elles des nano vecteurs d'intérêt pour le développement de nouvelles thérapies.

L'objectif de ma thèse est de produire des HDL enrichies en AAT et de caractériser leurs propriétés structurales et fonctionnelles, notamment leurs activités anti-inflammatoires protectrices sur un modèle cellulaire et *in vivo* chez la souris. Grâce aux nanoparticules (rHDL) produites, mon travail a également visé l'exploration de voies d'administration originales comme l'inhalation pour le traitement des pathologies vasculaires ou pulmonaires.

Pour répondre à ces objectifs, l'ApoA-I recombinante (rApoA-I) fusionnée à une étiquette histidine clivable a été produite au sein de la bactérie *Clear coli*. Après clivage de l'étiquette et purification par chromatographie d'affinité, la caractérisation de rApoA-I a été réalisée par électrophorèse SDS-PAGE, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire. Les rHDL ont été constituées selon un protocole utilisant du cholate de sodium, en combinant l'ApoA-I purifiée et caractérisée avec de la phosphatidylcholine selon un ratio molaire 1 : 75. Les techniques de diffusion dynamique de la lumière et de microscopie électronique ont permis de déterminer une taille des rHDL d'environ 7 nm et une morphologie similaire aux pré-β-HDL naturelles.

La caractérisation fonctionnelle sur des cellules endothéliales (EA.hy926) et épithéliales (A549) montre une capacité d'internalisation rapide des rHDL tout en préservant la viabilité cellulaire. De plus, une diminution de l'expression de la cytokine IL-6 et de la molécule d'adhésion ICAM-1 par les EA.hy926 incubées avec les rHDL atteste de leur capacité anti-inflammatoire et de protection endothéliale.

In vivo, le test de biodisponibilité effectué chez la souris C57BL/6, révèle une bonne captation des rHDL par les poumons, 6 h après leur administration par aérosolisation.

L'enrichissement des nanoparticules avec de l'AAT a démontré que même en présence d'un enrichissement modeste des rHDL, celles-ci présentent, *in vitro*, des activités anti-inflammatoires et de protection de l'endothélium significatives ainsi qu'une activité anti-élastase notable.

Ces résultats montrent que les rHDL produites à partir d'ApoA-I recombinante présentent des effets protecteurs. La répartition homogène des rHDL au sein des poumons et l'absence de cytotoxicité permettent d'envisager leur utilisation dans le traitement de maladies inflammatoires pulmonaires telles que l'emphysème pulmonaire. De plus, l'enrichissement des rHDL avec l'AAT a permis de montrer que l'activité anti-élastase de l'enzyme nécessaire à son rôle anti-inflammatoire était préservée..

Ainsi, les résultats de mon travail de thèse apportent des éléments de validation importants pour la préparation et l'utilisation des rHDL comme nano vecteurs de composés thérapeutiques administrables par voie pulmonaire.

Mots clés : HDL, lipoprotéines, apolipoprotéine A-I nanoparticules, vectorisation, alpha-1-antitrypsine, aérosolisation, anti-inflammatoire