



**HAL**  
open science

# Lipoprotéines de haute densité (HDL). Implications diagnostiques et thérapeutiques au cours de la COVID 19.

Floran Bègue

## ► To cite this version:

Floran Bègue. Lipoprotéines de haute densité (HDL). Implications diagnostiques et thérapeutiques au cours de la COVID 19.. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de la Réunion, 2024. Français. NNT : 2024LARE0002 . tel-04592478

**HAL Id: tel-04592478**

**<https://theses.hal.science/tel-04592478v1>**

Submitted on 29 May 2024

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

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

# Thèse de doctorat

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

École doctorale

**Sciences, Technologies et Santé**

Discipline

**Biologie Médical Santé**

Unité de recherche

**INSERM UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien**

## **Lipoprotéines de haute densité (HDL) Implications diagnostiques et thérapeutiques au cours de la COVID-19**

Présentée et soutenue publiquement à La Réunion le 9 février 2024 par

**Floran BEGUE**

**Composition du Jury :**

<b>Dr Muriel LAFFARGUE</b>	Université Paul Sabatier	Présidente de jury
<b>Pr Alice BLET</b>	Hospices Civils de Lyon	Rapporteuse
<b>Dr Pascale KREJBICH</b>	Université de La Réunion	Examinatrice
<b>Dr Benoit ALLARD</b>	Université de La Réunion	Examinateur
<b>Dr Philippe RONDEAU</b>	Université de La Réunion	Directeur de thèse
<b>Pr Emmanuel BOURDON</b>	Université de La Réunion	Co-directeur de thèse
<b>Dr Olivier MEILHAC</b>	Université de La Réunion	Encadrant
<b>Dr Joël COUPRIE</b>	Université de La Réunion	Encadrant

*Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne – Fonds européen de développement régional*

(FEDER) PO 2021-2027





*Pa kapab lé mor san eséyé  
Pas capable est mort sans essayer*

*Ti pa, ti pa narivé  
Patience, petit à petit, nous arriverons*

*“Success is the sum of small efforts - repeated day in and day out” – Robert Collier*

« Tout le monde est un génie. Mais si vous jugez un poisson sur ses capacités à grimper à un arbre, il passera sa vie à croire qu’il est stupide » – Albert Einstein



*À ma famille,  
À mes grands-parents,  
À mes parents,*



# Remerciement

Tout d'abord, je souhaite témoigner ma profonde gratitude, respect et reconnaissance envers ma direction de thèse, **Philippe, Manu, Olivier et Joël**. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. **Philippe**, je te remercie pour tes conseils judicieux et de m'avoir encouragé à diversifier au maximum les techniques utilisées, car, à tes yeux, une thèse de qualité est une thèse riche en technique. Je te remercie pour ton soutien technique tout au long de ces années de thèse. **Manu**, je tiens à te remercier pour ta positivité omniprésente, pour tous tes conseils et tes encouragements, notamment sur le point rédactionnel. **Joël**, un grand merci pour ta bienveillance, ton soutien et tes conseils tout au long de mon parcours. **Olivier**, je te suis reconnaissant de m'avoir accueilli au sein du laboratoire DÉTROI dès mon master 1. **MERCI** pour ta bienveillance, tes expressions faciales inimitables, tes conseils précieux, nos échanges scientifiques ou non. Surtout, je tiens à te remercier pour le temps que tu as toujours su trouver pour m'écouter, malgré ton emploi du temps chargé de directeur de laboratoire. Sans **cette équipe de direction**, je n'aurai pas pu réaliser cette thèse, **MERCI**.

Je suis reconnaissant envers la **Région Réunion** pour son soutien financier sur la période de trois ans de ma thèse, qui a grandement contribué au bon déroulement de mes travaux de thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers les membres de mon jury pour avoir accepté de participer à évaluer et à enrichir ma thèse grâce à vos lectures avisées et les discussions qui m'ont permis de la perfectionner. Mes remerciements sincères vont à mes rapportrices, **Pr Alice BLET** et **Dr Muriel LAFFARGUE**, ainsi qu'à mes examinateurs, **Dr Pascale KREJBICH-TROTOT** et **Dr Benoit ALLARD**.

J'exprime mes sincères remerciements aux membres de mon comité de thèse, les Docteurs **Anatole KONTUSH**, **Aurélien Olichon**, **Sandrine DELBOSC** et le Professeur **Philippe GASQUE** qui ont su me guider et me soutenir tout au long de cette période de recherche.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à l'équipe technique du laboratoire. **Pierre** pour tes talents de pâtissier. **Jessica** pour ta rigueur. **Cynthia et Shivani** pour votre bonne humeur. **Bringelle** pour nos échanges sur nos passions mécaniques communes. Je vous remercie également pour vos conseils, nos échanges et votre soutien technique précieux au cours de ma thèse.

**Bryan** (José) et **Sébastien TANAKA**, sans vous, je ne pense pas que ma thèse aurait été la même. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers toi, Bryan, que j'ai rencontré pendant mon stage de Master 2, et avec qui le courant est tout de suite passé. Tu es une personne remarquable, tu as su me transmettre la passion de la spectrométrie de masse. Tu as toujours été là, qu'importe les horaires, pour lancer une manip, discuter, conseiller et ce malgré les menaces de nos chères et tendres. Merci José pour tout ton soutien, les moments de joies, les repas et la motivation au travail que nous avons conservé tout au long de ces années. **Sébastien**, je te remercie pour toute ta motivation, nos échanges, ta soif de publication et ta capacité à motiver les troupes.

Mes remerciements vont à **La première ligne, Grégoire, Julien et Teva**. Nous avons développé cette synergie de travail en master, ce qui nous a permis d'entreprendre ce travail de thèse. Tout au long de ces années de doctorat, nous avons su nous soutenir mutuellement dans notre parcours. Le fait de mener cette thèse avec vous m'a permis de réaliser mes recherches toujours dans la bonne humeur, malgré les moments difficiles du doctorat. Merci encore pour tous ces bons moments, ces fous rires et ces moments joies. J'espère que l'on continuera à partager d'aussi bons moments après notre doctorat.

J'exprime mes sincères remerciements à mes collègues, doctorants, docteurs pour nos échanges enrichissants, les repas partagés ainsi que l'ensemble de nos moments vécus durant cette thèse. En particulier, Laurine, Chloé, Sarah, Marie, Aurélie, TKT (Katy), Stéphane, Eloïse, Guillaume, Zarouki, Janice, Angélique, Sandhya, Kevin, Danielle, Batoul, Ali, Elena, Patole (Séb) et Romuald. Je tiens à remercier tout particulièrement **Laura** pour les instants partagés autour d'un dessert, son écoute attentive et son soutien précieux durant ces années de thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'unité DÉTROI pour les discussions riches et leur bonne humeur notamment Christine, Christian, Steeve, Jean-Loup, Marie-Paule, Estelle, Gilles et David.

Je tiens à remercier **Nico**, pour ces encouragements, sa bonne humeur et en particulier pour sa question récurrente : « *Est-ce que vous êtes heureux aujourd'hui ?* ». Je tiens aussi à remercier **Wil**, pour nos échanges riches, tant sur le plan scientifique que divers et pour son soutien, à la fois technique et moral.

Ma thèse ayant commencé au CYROI, cela m'a permis de rencontrer plusieurs personnes formidables provenant de différentes unités. Merci au **membre du CYROI**, Fanny, Imade et Séb pour leur bonne humeur, Johnny, Éric et Céline. Sans oublier Jimmy et Jennyfer pour nos discussions, le dépannage de certaines solutions et matériels pour la spectrométrie de masse. Je tiens à remercier aussi les collègues, docteurs, doctorant de **l'unité de PIMIT** pour nos discussions scientifiques ou non, notamment Jonathan qui a migré à DÉTROIT en post-doctorat, Daed, Toscane, Jason, Axel et les libanaises.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à l'ensemble de l'équipe du **département d'anesthésie et de réanimation de l'hôpital universitaire Bichat Claude-Bernard et du CHU de La Réunion**, pour leur confiance, la relecture des papiers et l'ensemble des échantillons qui m'ont permis de mener à bien ma thèse.

Un très grand merci à mes amis **DD, Clément, Daniel, Dylan et John**, même si je n'ai pas été très présent durant ces années de thèse, pour leur soutien, leurs encouragements et nos moments d'euphories lors de nos retrouvailles.

Mes remerciements vont aussi à toute ma **famille**, mes grands-parents, marraine, parrain, taties, tontons, cousins, cousines, petites cousines. Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait tout au long de ces années de thèse.

J'adresse mes profonds remerciements à mes **parents** et mon Bro, **Fabien. Papa et Maman**, vous avez toujours tout fait pour ma réussite et que je ne manque de rien. Vous m'avez toujours encouragé à aller le plus loin possible et à ne pas me reposer sur mes acquis. Je vous dédis ce travail de thèse, résultat d'un travail acharné, et je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez pu faire pour moi.

Enfin, je remercie infiniment **mon rayon de lune**, pour son soutien durant la thèse et surtout au cours de la rédaction de ce manuscrit. Je te suis reconnaissant de m'avoir sans cesse répété que « j'allais y arriver », surtout à la fin. **MERCI** pour ta patience, ta présence, ta compréhension et ton implication pendant toutes ces années d'études. Toutes tes actions me montrent chaque jour à quel point tu es une personne exceptionnelle. Merci pour tout.





# Table des matières

Liste des figures	17
Liste des tableaux	19
Liste des abréviations	21
Productions scientifiques	24
Publications directement issues de mon travail de thèse	24
Publication de revue	24
Autres publication issues de travail collaboratif	25
Communication orale lors de congrès	25
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>27</b>
<b>SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>33</b>
<b>I. Les lipoprotéines au cœur du transport des lipides</b>	<b>35</b>
<b>A. Structure et fonction des lipoprotéines</b>	<b>35</b>
<b>B. Les sous-classes de lipoprotéines</b>	<b>35</b>
<b>C. Métabolisme des lipoprotéines</b>	<b>38</b>
1. La voie exogène	38
2. La voie endogène	41
3. Le transport inverse du cholestérol	44
<b>D. Les apolipoprotéines régulatrices du métabolisme lipidique</b>	<b>44</b>
1. Les apolipoprotéines A	46
2. Les apolipoprotéines B	47
3. Les apolipoprotéines C	48
4. L'apolipoprotéine E	49
5. L'apolipoprotéine (a)	50
<b>II. Focus sur les Lipoprotéines de Haute Densité (HDL)</b>	<b>51</b>
<b>A. Biogenèse, remodelage et catabolisme des HDL</b>	<b>52</b>
1. Biogenèse des HDL	52
2. Remodelage et catabolisme des HDL	54
3. Catabolisme des HDL	58

<b>B. L'hétérogénéité de la structure des HDL</b>	<b>60</b>
<b>1. La classification des sous-populations de HDL</b>	<b>60</b>
<b>2. Le protéome des HDL : une diversité fonctionnelle</b>	<b>67</b>
<b>a) Les apolipoprotéines</b>	<b>72</b>
(1) L'apolipoprotéine D	72
(2) L'apolipoprotéine H	72
(3) L'apolipoprotéine J	72
(4) L'apolipoprotéine L	72
(5) L'apolipoprotéine M	73
<b>b) Les enzymes</b>	<b>73</b>
(1) Lécithine Cholestérol Acyltransférase (LCAT)	74
(2) Phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (PAF-AH/LpPLA <sub>2</sub> )	74
(3) Paraoxonase	75
<b>c) Les protéines de transfert de lipides</b>	<b>76</b>
(1) Phospholipid Transfer Protein (PLTP)	76
(2) Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)	76
<b>3. Le lipidome des HDL</b>	<b>78</b>
<b>4. Les autres composants des HDL</b>	<b>82</b>
<b>C. Les propriétés pléiotropes des HDL</b>	<b>83</b>
<b>1. Les propriétés anti-inflammatoires</b>	<b>86</b>
<b>2. Les propriétés antioxydantes</b>	<b>88</b>
<b>3. Les propriétés anti-apoptotiques</b>	<b>90</b>
<b>4. Les propriétés anti-infectieuses</b>	<b>91</b>
<b>D. Modification des HDL en situation pathologique</b>	<b>93</b>
<b>1. Protéome des HDL durant l'inflammation</b>	<b>93</b>
(1) Sérum amyloïde A	93
(2) Alpha-1-acide glycoprotéine	94
(3) Alpha-1-antitrypsine	94
(4) Les protéines du complément	94
<b>2. Inflammation chronique – Diabète, athérosclérose</b>	<b>95</b>
<b>3. Inflammation aiguë - dysfonction en situation de sepsis bactérien</b>	<b>99</b>
<b>III. HDL mimétique à des fins thérapeutiques</b>	<b>102</b>
<b>A. Les différentes HDL mimétiques</b>	<b>102</b>
<b>1. SRC-rHDL/CSL111</b>	<b>104</b>
<b>2. CSL112</b>	<b>104</b>
<b>3. CER-001</b>	<b>105</b>
<b>4. ETC-216, MDCO-216</b>	<b>105</b>
<b>5. ETC-642</b>	<b>105</b>

B. Supplémentation en nanoparticules d'Apo A-I en situation de perturbation métabolique _____	106
C. Perfusion de HDL mimétiques en situation d'inflammation aiguë au cours d'une infection _____	112
<b>VALORISATION BIBLIOGRAPHIQUE _____</b>	<b>115</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE _____</b>	<b>125</b>
<b>TRAVAUX DE RECHERCHE _____</b>	<b>131</b>
<b>PARTIE I. ALTÉRATION DE L'APOLIPOPROTÉOME DES PATIENTS</b>	
<b>EN RÉANIMATION POUR LEUR COVID-19 _____</b>	<b>133</b>
A. Introduction et objectifs _____	134
B. Résultats _____	136
C. Discussions et perspectives _____	159
<b>PARTIE II. ALTÉRATION DE LA COMPOSITION ET DES FONCTIONS</b>	
<b>DES LIPOPROTÉINES AU COURS DE LA COVID-19 SÉVÈRE _____</b>	<b>165</b>
A. Introduction et objectifs _____	167
B. Résultats _____	171
C. Discussion et perspectives _____	241
<b>PARTIE III. PREMIÈRE ADMINISTRATION DE NANOPARTICULES</b>	
<b>D'APO A-I RECOMBINANTE CHEZ UNE PATIENTE SOUFFRANT D'UNE</b> <b>COVID-19 SÉVÈRE _____</b>	<b>253</b>
A. Introduction et objectifs _____	255
B. Résultats _____	256
C. Discussion et perspectives _____	279
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES _____</b>	<b>285</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____</b>	<b>293</b>
<b>TRAVAUX COLLABORATIFS _____</b>	<b>339</b>

# Résumé

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont essentielles pour une bonne santé cardiovasculaire, grâce notamment à leur transport « inverse » du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son élimination. De plus, les HDL exercent de nombreuses autres activités bénéfiques à la fois de type anti-inflammatoire, antioxydantes et anti-infectieuses.

Lors de situations inflammatoires, comme celles rencontrées lors d'infections bactériennes ou virales, les HDL peuvent subir des altérations tant quantitatives de baisse de concentration circulantes que qualitatives, comme la modification de composition et perte d'activités protectrices.

L'humanité fait toujours face à la maladie au coronavirus (COVID-19) caractérisée par une inflammation aiguë et à l'origine de plus de 6,9 millions de morts dans le monde à ce jour.

Aussi, mon travail de thèse a visé la caractérisation des modifications tant quantitatives que qualitatives des HDL durant la COVID-19, l'identification de biomarqueurs spécifiques de modifications retrouvées dans ces HDL et l'essai thérapeutique d'une supplémentation en HDL mimétiques au cours de cette maladie.

La quantification des lipoprotéines circulantes dans le plasma de patients atteints de COVID-19 sévère montre une diminution importante du HDL-cholestérol et d'autres lipoprotéines pouvant constituer autant de biomarqueurs prédictifs de sévérité de la maladie. L'analyse de la distribution des lipoprotéines montre un profil pro-athérogène avec notamment la présence de lipoprotéines de basses densités (LDL) petites et denses dans les plasmas des patients atteints de COVID-19 sévère.

L'analyse qualitative par spectrométrie de masse de la composition tant des HDL que des LDL, montre une présence accrue en protéines de la phase aiguë de l'inflammation au détriment de la partie apoprotéique de ces lipoprotéines quand elles sont isolées de plasma de patients atteints de COVID-19.

Testées sur des cellules endothéliales humaines en culture primaire, les HDL présentent une altération significative de leurs propriétés anti-apoptotique et anti-inflammatoire, lorsqu'elles sont purifiées à partir de plasma de patients atteints de COVID-19.

Enfin, des propriétés anti-inflammatoires d'injections répétées de HDL recombinantes ont pu être mises en évidence chez une patiente admise en réanimation et souffrant d'une forme grave de COVID-19.

Pour conclure, mon travail de thèse apporte des éléments nouveaux de connaissance sur les modifications des lipoprotéines lors de maladie infectieuse, en l'occurrence la COVID-19. Il ouvre aussi des perspectives prometteuses de recherches pour l'utilisation des HDL à la fois comme biomarqueur de sévérité de maladies inflammatoires que comme moyen de lutte thérapeutique.

**Mot-clés** : HDL, protéome, LDL, COVID-19, inflammation, apolipoprotéome, CER-001.

# Abstract

High-density lipoproteins (HDL) are crucial for maintaining good cardiovascular health due to their ability to transport cholesterol from peripheral tissues to the liver for elimination via a "reverse transport of cholesterol" mechanism. Moreover, HDL exhibits several other advantageous properties, including anti-inflammatory, antioxidant, and anti-infectious activities. In inflammatory situations, such as those encountered during viral infections, HDL can undergo both quantitative alterations, with a drop in circulating concentration, and qualitative alterations, such as a change in composition and loss of protective activities. Humanity is still struggling with coronavirus disease (COVID-19), characterized by acute inflammation and responsible for over 6.9 million deaths worldwide to date.

The aim of my thesis was to characterize the quantitative and qualitative changes in HDL during COVID-19, to identify specific biomarkers of the changes found in HDL, and to conduct a therapeutic trial of HDL mimetic supplementation during this disease.

Quantification of circulating lipoproteins in the plasma of patients with severe COVID-19 shows a significant decrease in HDL and other lipoproteins, which may be predictive biomarkers of disease severity. Analysis of lipoprotein distribution shows a pro-atherogenic profile, with the presence of small, dense low-density lipoproteins (LDL) in the plasmas of patients with severe COVID-19.

Qualitative mass spectrometry analysis of the composition of both HDL and LDL showed an increased presence of proteins from the acute phase of inflammation, to the detriment of the apoprotein part of these lipoproteins when isolated from the plasma of COVID-19 patients. When tested on human endothelial cells from primary culture, HDL demonstrated a significant alteration in their anti-apoptotic and anti-inflammatory properties when purified from the plasma of COVID-19 patients.

Finally, the anti-inflammatory properties of recombinant HDL injections were demonstrated in a patient admitted to intensive care with a severe form of COVID-19.

In conclusion, my thesis work provides some new insights into lipoprotein modifications during infectious disease, in this case COVID-19. It also opens up promising prospects for research into the use of HDL both as a biomarker of inflammatory disease severity and as a means of therapeutic control.

**Keywords:** HDL, proteome, LDL, COVID-19, inflammation, apolipoproteome, CER-001.



# Liste des figures

Figure 1. Structure d'une lipoprotéine .....	35
Figure 2. Isolement des lipoprotéines par ultracentrifugation par flottaison séquentielle. ....	36
Figure 3. Principales classes de lipoprotéines en fonction de leur densité .....	37
Figure 4. Voie exogène du métabolisme des lipoprotéines .....	40
Figure 5. La voie endogène du métabolisme des lipoprotéines .....	43
Figure 6. Biogenèse, remodelage et catabolisme des HDL.....	52
Figure 7. Remodelage des HDL par la voie ABCG1/SR-B1 .....	55
Figure 8. Voie de remodelage des HDL par la CETP .....	56
Figure 9. Voies de remodelage des HDL par la PLTP.....	57
Figure 10. Voies de remodelage des HDL par la HL/EL .....	58
Figure 11. Voie d'endocytose des HDL régulée par la F1-ATPase sur les hépatocytes .....	59
Figure 12. Hétérogénéité des sous-populations de HDL en fonction des techniques de séparations.....	61
Figure 13. Profil du cholestérol par <i>Verticale Auto Profile</i> .....	62
Figure 14. Évaluation des sous-populations de HDL par Lipoprint HDL. ....	63
Figure 15. Méthode de dosage des sous-classes de lipoprotéines et des métabolites par RMN couplée au module Bruker IVDr B.I. LISA. ....	65
Figure 16. Composition en protéines des HDL par spectrométrie de masse sur 2D-PAGE .....	68
Figure 17. Analyse fonctionnelle des protéines identifiées dans le protéome des HDL.....	69
Figure 18. Caractérisation du protéome des HDL par protéomique <i>shotgun</i> .....	70
Figure 19. Profils d'abondance des protéines représentatives des sous-populations de HDL .....	77
Figure 20. Les composants des HDL et l'impact des microARN transportés par les HDL ...	82
Figure 21. Les propriétés pléiotropes des HDL .....	83
Figure 22. Progression schématique de l'athérosclérose.....	84
Figure 23. Principales activités anti-inflammatoires des HDL dans les cellules endothéliales et les leucocytes .....	86
Figure 24. Principales activités antioxydantes des HDL.....	88
Figure 25. Principales activités anti-infectieuses des HDL.....	91
Figure 26. Modification de la composition et des propriétés des HDL au cours des maladies cardiovasculaires .....	95



Figure 27. Métabolisme altéré des HDL au cours du diabète de type 2 avec une hyperglycémie, l'insulino-résistance, l'hypertriglycéridémie et un stress oxydant élevés conduisant à une inflammation systémique chronique.....	98
Figure 28. Liens entre les concentrations en HDL-C, en Apo A-I et la mortalité associée aux maladies infectieuses en population générale .....	99
Figure 29. Relation entre le nombre et la taille des particules de HDL en fonction de la mortalité associée aux maladies infectieuses. ....	100
Figure 30. Altération des HDL et du profil lipidique pendant un sepsis bactérien.....	101
Figure 31. Chronologie des études humaines des thérapies de perfusion de HDL mimétiques .....	108
Figure 32. SARS-CoV-2 : de la structure aux complications.....	134
Figure 33. Diagramme de Venn des protéines identifiées et quantifiées associées aux HDL et LDL des patients COVID-19 par l'analyse en NanoLC-MS/MS.....	244
Figure 34. Réseau d'association des processus biologiques des protéines des lipoprotéines à Apo B des patients COVID-19. ....	245
Figure 35. Diagramme de Venn des protéines identifiées et quantifiée associées aux HDL selon la méthode de préparation des échantillons pour l'analyse en NanoLC-MS/MS. ....	246
Figure 36. Réseau d'association des processus biologiques des protéines moins abondantes des HDL de patients COVID-19 non-survivant. ....	248
Figure 37. Altération des concentrations circulantes des apolipoprotéines et de la LCAT : implication possible sur le métabolisme lipidique.....	287
Figure 38. Modifications des HDL en situation de COVID-19, perspectives sur les méthodes de dosages et d'analyse des fonctionnalités des HDL.....	289
Figure 39. Thérapie par HDL mimétiques dans le contexte de la COVID-19 et perspectives d'enrichissement et diverses voies d'administration des HDL mimétiques dans différentes infections.....	290

# Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques biochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines .....	38
Tableau 2. Caractéristiques des apolipoprotéines.....	45
Tableau 3. Principales sous-classes de HDL en fonction des différentes techniques d'isolement.....	66
Tableau 4. Composants majoritaires du protéome des HDL.....	71
Tableau 5. Principaux lipides du lipidome des HDL .....	78
Tableau 6. Avantages et limites des thérapies reposant sur l'infusion de HDL.....	103
Tableau 7. Résumé des effets vasculo-protecteurs des HDL mimétiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	107
Tableau 8. Liste des essais cliniques sur les infusions de HDL.....	109
Tableau 9. Résumé des résultats sur l'apolipoprotéome plasmatique .....	249



# Liste des abréviations

<b>2D-PAGE :</b>	Électrophorèse bidimensionnelle sur gel gradient de polyacrylamide
<b>A-SAA :</b>	Acute SAA
<b>AAT :</b>	Alpha-1-antitrypsine
<b>ABCA1 :</b>	<i>ATP-Binding Cassette Transporter A1</i>
<b>ABCB11 :</b>	<i>ATP Binding Cassette Transporter B11</i>
<b>ABCG1 :</b>	<i>ATP Binding Cassette Transporter G1</i>
<b>ABCG5/G8 :</b>	<i>ATP-binding cassette transporters G5/G8</i>
<b>ACAT :</b>	<i>Acyl-CoA cholesterol acyl transferase</i>
<b>AG/FA :</b>	Acide gras
<b>AGE :</b>	Produit avancé de glycation
<b>AGP-1 :</b>	Alpha-1-acide glycoprotéine
<b>AMPK :</b>	Protéine kinase AMP-dépendante
<b>Apo :</b>	Apolipoprotéine
<b>ATF3 :</b>	<i>Activating Transcription Factor 3</i>
<b>CD-36 :</b>	<i>Cluster of differentiation 36</i>
<b>CE :</b>	Ester de cholestérol
<b>CEOOH :</b>	Ester de cholestérol peroxydée
<b>Cer :</b>	Céramide
<b>CETP :</b>	Cholesteryl Ester Transfer Protein
<b>CM :</b>	Chylomicron
<b>COVID-19 :</b>	Coronavirus disease-2019
<b>DAG :</b>	Diacylglycérol
<b>DGAT :</b>	Diacylglycérol transférase
<b>DMPC :</b>	Dimyristoylphosphatidylcholine
<b>DPPC :</b>	Dipalmitoylphosphatidylcholine
<b>DT2 :</b>	Diabète de type 2
<b>EL :</b>	Lipase endothéliale
<b>FATP :</b>	<i>Fatty Acid Transporter Protein</i>
<b>FC/CL :</b>	Cholestérol libre
<b>FPLC :</b>	Chromatographie liquide rapide des protéines
<b>GPIHBP1 :</b>	<i>Glycophosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein-1</i>
<b>GSPx-3 :</b>	<i>Glutathione Selenoperoxidase 3</i>
<b>HDL :</b>	Lipoprotéines de haute densité, <i>High-density lipoprotein</i>
<b>HDL-C :</b>	HDL-cholestérols
<b>HL :</b>	Lipase hépatique
<b>HSPG :</b>	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>
<b>HUVEC :</b>	<i>Human Umbilical Vein Endothelial cells</i>
<b>ICAM :</b>	<i>InterCellular Adhesion Molecule</i>
<b>IDL :</b>	Lipoprotéine de densité intermédiaire, <i>Intermediate-density lipoprotein</i>
<b>IL-1<math>\beta</math> :</b>	Interleukine 1 $\beta$

<b>IL-6 :</b>	Interleukine 6
<b>KIV :</b>	Kringle IV
<b>LBP :</b>	<i>LPS binding protein</i>
<b>LC :</b>	Chromatographie liquide
<b>LCAT :</b>	Lécithine cholestérol acyltransférase
<b>LDL :</b>	Lipoprotéines de basse densité, <i>Low-density lipoprotein</i>
<b>LDL-C :</b>	LDL-cholestérols
<b>LDLR :</b>	Récepteur au LDL
<b>LMF1 :</b>	<i>Lipase maturation factor 1</i>
<b>LOOH :</b>	Lipide peroxydée
<b>Lp(a) :</b>	Lipoprotéine (a)
<b>LpA-I :</b>	Lipoprotéine à Apo A-I
<b>LpA-I :A-II :</b>	Lipoprotéine à Apo A-I: A-II
<b>LpB :</b>	Lipoprotéine portant l'Apo B
<b>LPC :</b>	Lysophosphatidylcholines
<b>LpPLA2 :</b>	<i>Lipoprotein-associated phospholipase A2</i>
<b>LPS :</b>	Lipopolysaccharide
<b>LRP1 :</b>	<i>LDL Receptor-related Protein 1</i>
<b>LTA :</b>	Acide lipotéichoïque
<b>LXR :</b>	<i>Liver X Receptors</i>
<b>MCP-1 :</b>	Monocyte chemoattractant protein-1
<b>MGAT :</b>	Monoacylglycérol acyltransférase
<b>MGO :</b>	<i>Methylglyoxal</i>
<b>miR :</b>	MicroARN
<b>MTTP :</b>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>
<b>NF-κB :</b>	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
<b>NOX :</b>	NADPH oxydase
<b>NPC1L1 :</b>	<i>Niemann-Pick C1 like 1</i>
<b>oxPL :</b>	Phospholipide oxydée
<b>PA :</b>	Acide phosphatidique
<b>PAF :</b>	Facteur d'activation des plaquettes
<b>PAF-AH :</b>	<i>Platelet-activating factor acetyl hydrolase</i>
<b>PAI-1 :</b>	Plasminogène-1
<b>PE :</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>PG :</b>	Phosphatidylglycérol
<b>PI :</b>	Phosphatidylinositol
<b>PL :</b>	Phospholipides
<b>PLOOH :</b>	Phospholipide peroxydée
<b>PLTP :</b>	<i>Phospholipid Transfer Protein</i>
<b>PON :</b>	Paraoxonase
<b>POPC :</b>	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
<b>PPARs :</b>	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors</i>
<b>PS :</b>	Phosphatidylsérine
<b>PSM :</b>	Score de correspondance peptide-spectre

<b>PUFA :</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>rHDL :</b>	HDL reconstituée
<b>RMN :</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>ROS :</b>	<i>Reactive oxygen species</i>
<b>RXRs :</b>	<i>Retinoid X Receptors</i>
<b>S1P :</b>	Sphingosine-1-Phosphate
<b>S1PR :</b>	<i>Sphingosine-1-Phosphate receptor</i>
<b>SAA :</b>	Sérum amyloïde A
<b>SARS-CoV-2 :</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2</i>
<b>sdLDL :</b>	LDL petites et denses
<b>SFA :</b>	Acide gras saturé
<b>SM :</b>	Sphingomyéline
<b>sPLA2 :</b>	PLA2 sécrétée
<b>SR-B1 :</b>	<i>Scavenger Receptor-B1</i>
<b>TG :</b>	Triglycérides
<b>TICE :</b>	Excrétion <i>trans</i> intestinale du cholestérol
<b>TLR :</b>	<i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math> :</b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>TRL :</b>	Lipoprotéine riche en triglycérides
<b>UC :</b>	Ultracentrifugation
<b>VCAM :</b>	<i>Vascular Cellular Adhesion Molecule</i>
<b>VLDL :</b>	Lipoprotéine de très basse densité, <i>Very-low-density lipoprotein</i>

# Productions scientifiques

## Publications directement issues de mon travail de thèse

**Begue F**, Tanaka S, Mouktadi Z, Rondeau P, Veeren B, Diotel N, Tran-Dinh A, Robert T, Vélia E, Mavingui P, Lagrange-Xélot M, Montravers P, Couret D, Meilhac O. "Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19." *Sci Rep*. 2021.

Tanaka S\* and **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. "First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation." *Biomedicines*. 2022. \* **co-premier auteur**.

**Begue F**, Chemello K, Veeren B, Lortat-Jacob B, Tran-Dinh A, Zappella N, Snauwaert A, Robert T, Rondeau P, Lagrange-Xelot M, Montravers P, Couret D, Tanaka S, Meilhac O. "Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID-19 Patients: Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study." *Int J Mol Sci*. 2023.

**Begue F**, Veeren B, Apalama ML, Mouktadi Z, Mavingui P, Lortat-Jacob B, Atchade E, Zappella N, Lagrange-Xelot M, Montraver P, Rondeau P, Couret D, Tanaka S, and Meilhac O. "Atherogenic lipoprotein modifications during severe COVID 19". *En soumission*.

**Begue F**, Veeren B, Rondeau P, Florence AM, Montravers P, Tanaka S†, and Meilac O.† on behalf of French COVID Study Group. "HDL proteome and apolipoproteins concentrations in severe ICU COVID-19 patients." *En soumission*.

## Publication de revue

**Begue F\***, Apalama ML\*, Lambert G, Meilhac O. "HDL as a Treatment Target: Should We Abandon This Idea?". *Curr. Atherosclerosis Rep*. 2023. \* **co-premier auteur**.

## Autres publication issues de travail collaboratif

Delveaux J, Turpin C, Veeren B, Diotel N, Bravo SB, **Begue F**, Álvarez E, Meilhac O, Bourdon E, Rondeau P. “*Antirhea borbonica* Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages. ” *Antioxidants*. 2020.

Lebeau G, Frumence E, Turpin J, **Begue F**, Hoarau JJ, Gadea G, Krejbich-Trotot P, Desprès P, Viranaicken W. “Zika E Glycan Loop Region and Guillain-Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development.” *Vaccines*. 2021.

Safadi DE, Lebeau G, Lagrave A, Mélade J, Grondin L, Rosanaly S, **Begue F**, Hoareau M, Veeren B, Roche M, Hoarau JJ, Meilhac O, Mavingui P, Desprès P, Viranaïcken W, Krejbich-Trotot P. “Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection.” *Viruses*. 2023.

## Communication orale lors de congrès

**Begue F**, Tanaka S, Mouktadi Z, Rondeau P, Veeren B, Diotel N, Tran-Dinh A, Robert T, Vélia E, Mavingui P, Lagrange-Xélot M, Montravers P, Couret D, Meilhac O. “Alteration of lipoprotein (HDL and LDL) compositions and HDL functions during severe COVID-19.” 16<sup>ème</sup> congrès de la Nouvelle Société Française d’Athérosclérose e-congrès (Juin 2021).





# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



Les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*High-Density Lipoproteins*) sont responsables du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, assurant son recyclage et son élimination par voie biliaire. Cette fonction permettrait de réduire l'accumulation de lipides dans la paroi des artères, conférant aux HDL des propriétés athéro-protectrices. Les HDL ne se limitent pas à cette fonction unique de transport de lipides et possèdent également des propriétés pléiotropes protectrices comme des fonctions antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-infectieuses.

La composition protéique et lipidique des HDL est directement associée à l'ensemble de leurs propriétés protectrices. L'apolipoprotéine A-I (Apo A-I), la protéine majoritaire des HDL, confère à ces nanoparticules, leurs propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-apoptotiques. Les HDL transportent aussi d'autres protéines, notamment des enzymes antioxydantes, qui contribuent également aux propriétés protectrices de ces particules. Les HDL sont hétérogènes et sont subdivisées en sous-populations dans la circulation sanguine en raison des remodelages qu'elles subissent durant leur métabolisme. Chaque sous-population de HDL remplit différentes fonctions pendant leur métabolisme. Les HDL petites et denses sont plus antioxydantes et anti-inflammatoires, tandis que les HDL de plus grosse taille transportent majoritairement le cholestérol estérifié afin d'être éliminé ou recyclé.

Les concentrations circulantes en HDL-C peuvent se retrouver considérablement diminuées tant dans des situations d'inflammation chronique de bas grade comme celle rencontrée dans le diabète, que dans le cas d'inflammations aiguës comme celles associées à des infections induites par des pathogènes. Ainsi, une concentration basse en HDL-C peut représenter un biomarqueur de la sévérité des maladies infectieuses et des maladies cardiovasculaires.

La partie protéique d'Apo A-I constitue également un biomarqueur des maladies cardiovasculaires. En effet, une corrélation inverse existe entre l'incidence des maladies cardiovasculaires et les concentrations circulantes en Apo A-I. Au-delà des changements quantitatifs des HDL, ces nanoparticules sont aussi sujettes à des modifications structurales au cours de ces pathologies. Des altérations structurales, tant dans la composition des nanoparticules que de leur taille, peuvent être à l'origine d'un dysfonctionnement des HDL et affecter leurs propriétés pléiotropes.

Les altérations quantitatives et qualitatives des HDL rencontrées lors de pathologies peuvent être palliées par une thérapie reposant sur la supplémentation en particules de HDL mimétiques fonctionnelles. Ces infusions de HDL mimétiques ont été évaluées dans des modèles précliniques et ont fait l'objet d'essais cliniques, en particulier de sepsis inflammatoire. Aussi, une telle utilisation thérapeutique de HDL mimétiques constitue une piste de recherche d'intérêt.

En 2019, l'ensemble des habitants de la planète a été touché par une maladie infectieuse qui, à ce jour, a causé plus de 6,9 millions de morts dans le monde. Cette pathologie respiratoire a été nommée maladie au coronavirus 2019 (COVID-19, *Coronavirus disease-2019*) et elle est causée par une infection par le virus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus-2*). La COVID-19 a été identifiée pour la première fois à Wuhan, en Chine, en décembre 2019. La COVID-19 présente un large spectre de symptômes, allant de simples troubles grippaux à des complications pouvant entraîner une défaillance systémique et la mort. L'hyper-inflammation de la COVID-19 est marquée par une tempête cytokinique, caractérisée par une libération L'hyper-inflammation résulte de la suractivation de la réponse immunitaire causée par l'infection par le SARS-CoV-2 est marquée par une tempête cytokinique, caractérisée par une libération importante de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-6, *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) et de protéines hépatiques de la phase aiguë (sérum amyloïde A). Cette tempête cytokinique entraîne des lésions, notamment au niveau hépatique, ainsi qu'une dysfonction endothéliale qui provoque une modulation du métabolisme des lipides, conduisant ainsi à une dyslipidémie. Cette altération lipidique est marquée notamment par une modification des concentrations circulantes des lipoprotéines. Au-delà des aspects quantitatifs, les modifications de la composition et la fonctionnalité des lipoprotéines au cours de la COVID-19 étaient inconnues. De plus, il existe peu de marqueurs pronostiques de sévérité des maladies infectieuses ou métaboliques.

Mon travail de thèse se fonde sur l'hypothèse selon laquelle la structure et la fonction des HDL seraient altérées durant la COVID-19. Il repose également sur l'idée que la caractérisation de ces HDL durant la COVID-19 permettrait d'identifier des biomarqueurs de sévérité de la pathologie. La découverte de tels biomarqueurs pourrait servir à la mise en place d'un outil pronostique de sévérité de la maladie. Enfin, l'utilisation de supplémentation en HDL mimétique pourrait constituer une thérapie envisageable afin de limiter l'hyper-inflammation de l'infection induite par le SARS-CoV-2.

L'objectif de ma thèse a donc été, tout d'abord, de caractériser les modifications tant qualitatives que quantitatives des HDL au cours de l'inflammation induite par l'infection par le SARS-CoV-2, ensuite, d'identifier des biomarqueurs spécifiques de modifications retrouvés dans ces HDL et enfin, de tester l'efficacité thérapeutique d'une supplémentation en HDL mimétiques au cours de cette maladie.

Pour répondre à cet objectif, j'ai tout d'abord évalué les modifications quantitatives des apolipoprotéines circulantes dans le plasma de patients atteints de COVID-19 sévère et en service de réanimation. Puis, après isolement des LDL et HDL par ultracentrifugation, j'ai procédé à la caractérisation structurale et fonctionnelle (*in vitro*) des lipoprotéines. Enfin, les effets thérapeutiques d'une supplémentation en HDL mimétiques ont été testés chez une patiente en réanimation souffrant d'une forme grave de COVID-19.

Mon manuscrit de thèse commence par une synthèse bibliographique abordant en premier lieu une description générale des lipoprotéines. Un focus est ensuite porté sur le métabolisme, la structure, les fonctions et les dysfonctions des HDL en situation inflammatoire dans la deuxième partie de la synthèse. Enfin, la dernière partie de cette synthèse porte sur les thérapies reposant sur la supplémentation en HDL à partir de différents types d'HDL mimétiques, leur utilisation en cliniques dans les maladies cardiovasculaires et leur repositionnement thérapeutique contre le sepsis. L'objectif de ma thèse est ensuite explicité, suivi d'un exposé de mes travaux de thèse qui se déclinent en trois parties : La première partie porte sur les modifications de l'apolipoprotéome des patients atteints de COVID-19. La seconde partie se concentre sur les modifications structurales et fonctionnelles des lipoprotéines isolées des patients affectés par la COVID-19. La dernière partie de mes travaux, aborde les propriétés protectrices des injections de HDL mimétiques chez une patiente admise en soins critiques et souffrant de COVID-19 sévère. Enfin, je conclus mon mémoire avec les avancées sur les modifications des HDL au cours d'une infection et ouvre des perspectives de recherche sur l'utilisation des protéines associées aux HDL en tant qu'outils pronostiques et les effets protecteurs de la supplémentation en HDL au cours d'un sepsis viral.



# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



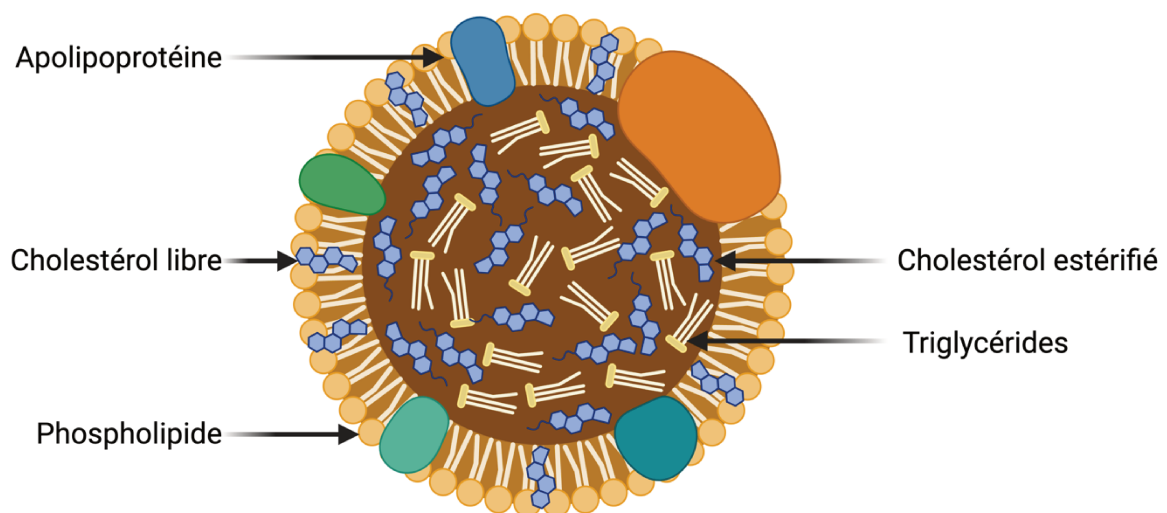


# I. Les lipoprotéines au cœur du transport des lipides

Les **lipides** (cholestérol non estérifié, ester de cholestérol, phospholipides et les triglycérides) sont des biomolécules hydrophobes. Cette propriété les empêche de circuler librement dans les milieux biologiques aqueux. Pour pallier cette limite, les lipides s'associent aux protéines amphiphiles, les **apolipoprotéines**. Cette association forme des complexes macromoléculaires : les **lipoprotéines**. Grâce à ces lipoprotéines, les lipides sont véhiculés dans les différents compartiments extracellulaires tels le sang, la lymphe et les liquides interstitiels (**Osborne and Brewer 1977; Brewer 1981**).

## A. Structure et fonction des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont toutes des particules composées d'un cœur lipidique hydrophobe constitué de lipides neutres qui sont les triglycérides et les esters de cholestérol. Ce noyau lipidique est protégé par une enveloppe amphiphile composée d'apolipoprotéines et de lipides polaires tel que les phospholipides et le cholestérol non estérifié ou libre (**Figure 1**).

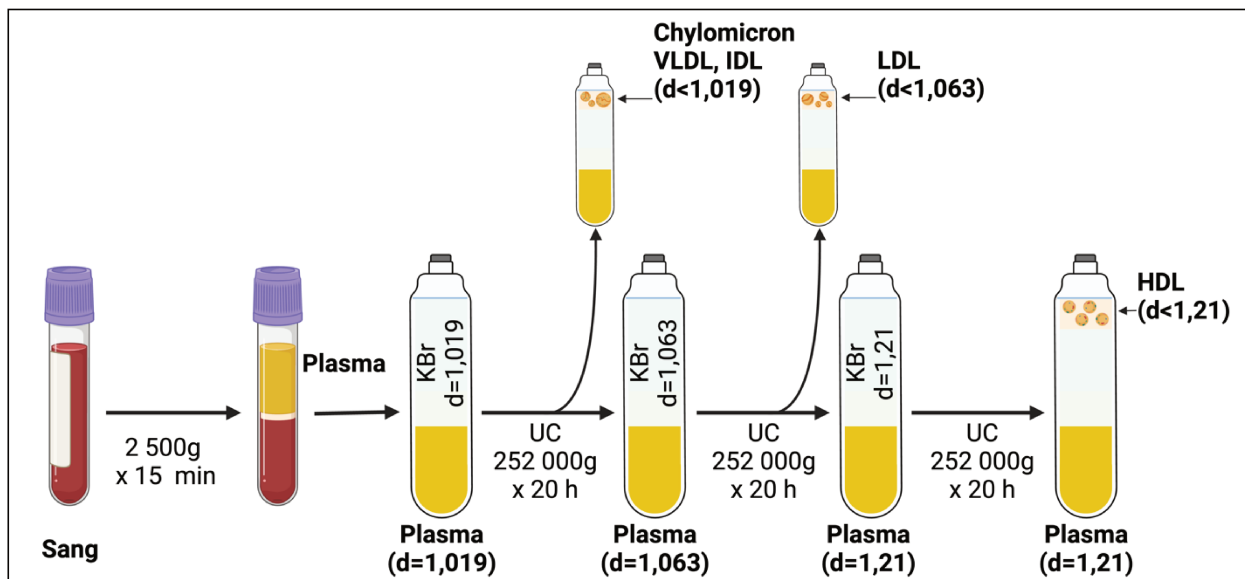


**Figure 1. Structure d'une lipoprotéine (inspirée de (Osborne and Brewer 1977)).**

## B. Les sous-classes de lipoprotéines

Ces lipoprotéines forment une famille hétérogène de particules classées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Elles ont d'abord été classées en deux grandes familles en se basant sur leurs mobilités électrophorétiques par rapport aux globulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Les lipoprotéines  $\alpha$  correspondent aux lipoprotéines de haute densité (HDL : *High-Density Lipoprotein*), tandis que les lipoprotéines  $\beta$  comprennent les chylomicrons, les lipoprotéines de très basses densités (VLDL : *Very-Low-Density Lipoprotein*), les lipoprotéines de densité intermédiaires (IDL : *Intermediate-Density Lipoprotein*) et les lipoprotéines de basses densités

(LDL : *Low-Density Lipoprotein*) (Noble 1968). De plus, les lipoprotéines se différencient par leurs proportions relatives en protéines et lipides. Cette caractéristique a permis d'affiner leur classification par ultracentrifugation (Havel et al. 1955).

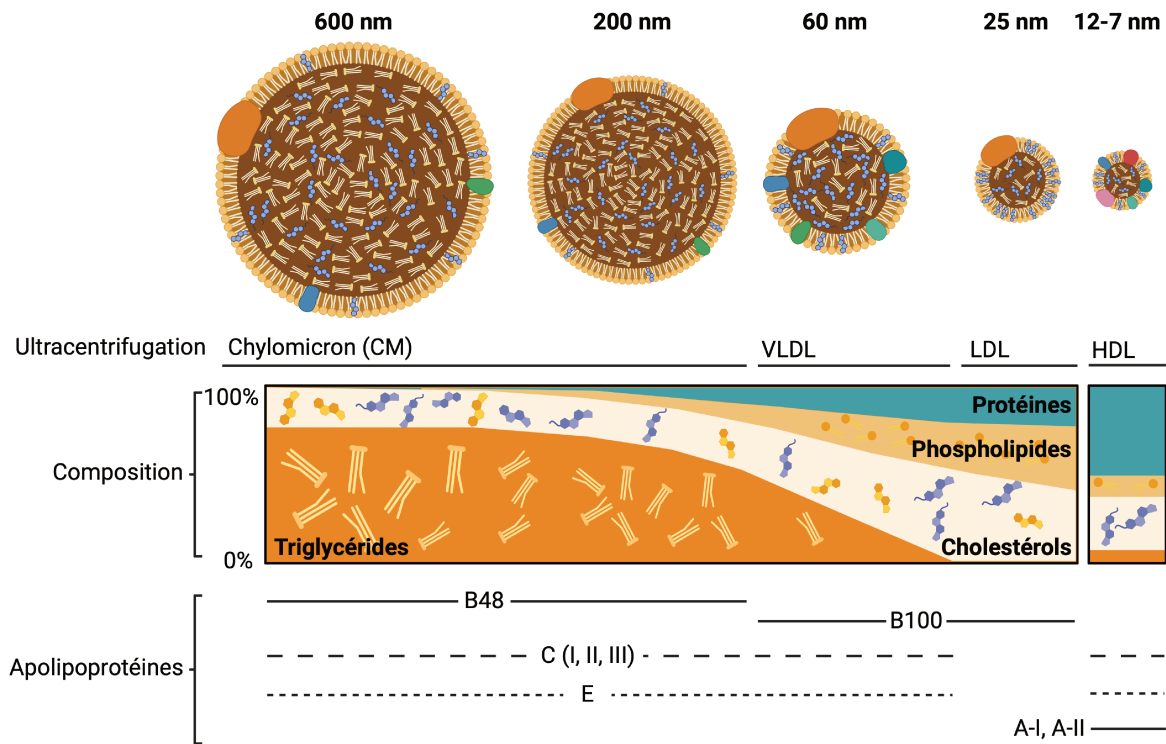


**Figure 2. Isolement des lipoprotéines par ultracentrifugation par flottaison séquentielle.**

L'**ultracentrifugation** par flottaison séquentielle est une technique qui permet de séparer et de classer les lipoprotéines en fonction de leur densité à partir de plasma. Le principe de la technique repose sur les propriétés physico-chimiques des lipoprotéines (Tableau 1). Les étapes d'ultracentrifugation des tubes de plasma sont réalisées à une vitesse élevée ( $> 150\,000g$ ) pendant une durée prolongée ( $> 18\text{ h}$ ). Ces paramètres varient en fonction du type de rotor et du volume des tubes utilisés. Pour faciliter la flottaison des lipoprotéines, des sels sont utilisés tels que bromure de potassium ou de bromure de sodium pour augmenter la densité du plasma aux limites de chaque classe de lipoprotéines. Cela permet de séparer séquentiellement les différentes particules en fonction de leur densité. Si l'on ne souhaite pas isoler les chylomicrons, nous partirons de plasma prélevé d'une personne à jeun depuis au moins 12 heures. Chaque classe de lipoprotéine est isolée à chaque ultracentrifugation. Pour isoler les VLDL et les IDL, le plasma est alourdi à 1,019 puis centrifugé. Le plasma est ensuite récupéré et alourdi à 1,063 pour isoler les LDL. Après l'ultracentrifugation des LDL, le plasma est récupéré puis alourdi à 1,21 pour isoler les HDL. Pour chaque ultracentrifugation, le plasma alourdi est recouvert d'une solution de densité identique à celle fraction alourdie. Après chaque ultracentrifugation, les différentes classes de lipoprotéines sont récupérées au sommet du gradient de densité. L'excédent de sel est ensuite éliminé par dialyse dans du tampon phosphate ou salin (Figure 2) (Schumaker and Puppione 1986; Ortiz-Muñoz et al. 2009).

Les lipides étant moins denses que l'eau et les protéines, le ratio lipides/protéines des lipoprotéines les subdivise en cinq populations allant des moins denses aux plus denses : chylomicrons, VLDL, IDL, LDL et HDL. Une sixième population de lipoprotéines a été découverte postérieurement, la lipoprotéine (a) (Lp(a)) avec une densité située entre les LDL et les HDL (Havel et al. 1955; Fless et al. 1984; Maranhão et al. 2014). Les lipoprotéines se distinguent aussi par leur taille avec leur diamètre inversement corrélé à leur densité. Ainsi, la lipoprotéine la plus volumineuse est le chylomicron tandis que la plus petite est la HDL. En

plus de ces différences de taille et de densité, les lipoprotéines se différencient également par leur composition lipidique, notamment au niveau de leur cœur lipidique. Les chylomicrons et les VLDL transportent majoritairement des triglycérides alors que les LDL, les Lp(a) et les HDL transportent principalement du cholestérol libre et estérifié. Enfin, les lipoprotéines se différencient aussi par leur composition en apolipoprotéines (Apo). Cette classification repose sur l'apolipoprotéine la plus abondante et ayant l'activité biologique la plus importante. D'après cette classification, deux groupes de lipoprotéines sont distingués : le premier groupe correspond aux lipoprotéines portant l'Apo B (LpB) telles que l'Apo B100 ou l'Apo B48. Ce sont les lipoprotéines de faibles densités, telles que les chylomicrons, les VLDL, IDL, les LDL et la Lp(a). Le deuxième groupe comprend les lipoprotéines portant de l'Apo A-I comme les HDL (Jonas and Phillips 2008; Maranhão et al. 2014).



**Figure 3. Principales classes de lipoprotéines en fonction de leur densité (adaptée de (Jonas and Phillips 2008)).**

L'ensemble des caractéristiques des différentes sous-familles de lipoprotéines est résumé dans le **Tableau 1 (Figure 3)**.

**Tableau 1. Caractéristiques biochimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines (Feingold 2000).**

Lipoprotéines	Type	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Lipide total (% masse)	Principales Apolipoprotéines	Lipide majoritaire
Chylomicrons	LpB	< 0,930	75-1200	98	B48, E	TG, PL
VLDL	LpB	0,930 - 1,006	30-80	90	B100, C-I, C-II, C-III, E	TG, CE
IDL	LpB	1,006 - 1,019	27-35	83	B100, E	TG, CE, CH
LDL	LpB	1,019 - 1,063	18-27	77	B100	CE, CH
Lp(a)	LpB	1,055 - 1,120	25	77	B100, (a)	CE, CH
HDL2	HDL	1,063 - 1,125	9-12	58	A-I, A-II	CE, CH, PL
HDL3	HDL	1,125 - 1,210	7-9	44	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, E	CE, CH, PL
Préβ-HDL	HDL	1,210 - 1,250	<7	9	A-I	CE, CH, PL

VLDL : very low-density lipoprotein, IDL : intermediate-density lipoprotein, LDL: low-density lipoprotein, Lp(a): lipoprotein (a), HDL: high-density lipoprotein, LpB: lipoprotéine à apoB, TG: triglycérides, PL: phospholipides, CE : cholestérol estérifié, CH : cholestérol libre ou non estérifié.

## C. Métabolisme des lipoprotéines

En raison de leur hydrophobicité, les lipides sont transportés par des complexes macromoléculaires, les lipoprotéines (Brewer 1981). Ces lipides sont de deux origines : soit exogènes provenant de l'alimentation ou soit endogènes provenant de la synthèse hépatique ou des tissus périphériques.

### 1. La voie exogène

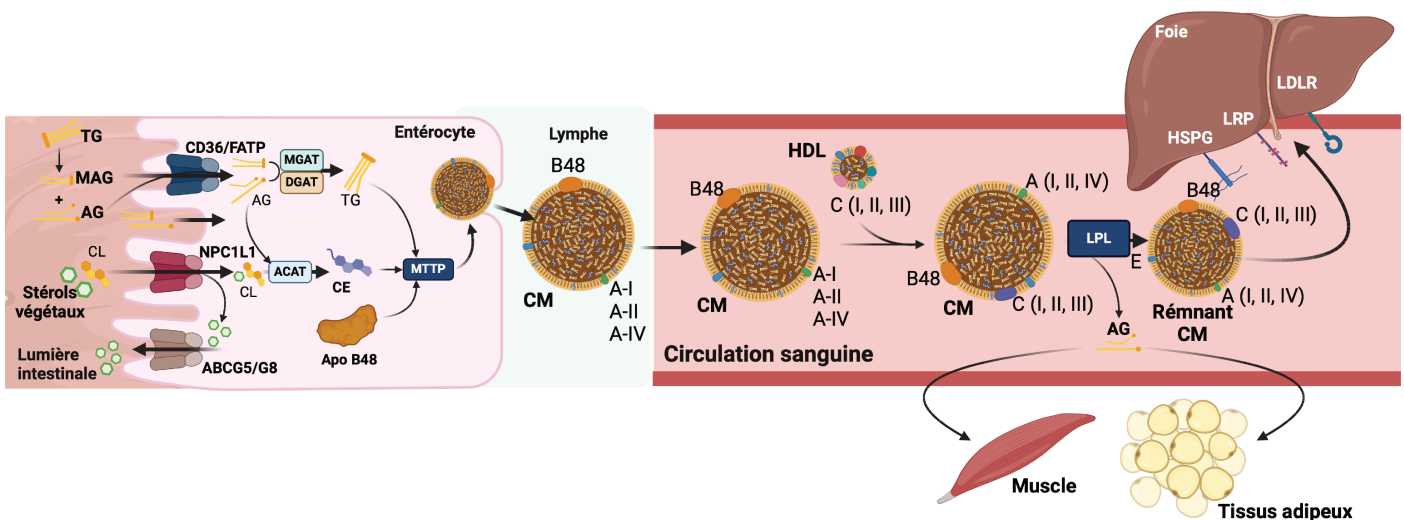
En situation postprandiale, le pool lipidique gastrique peut se composer de cholestérol libre, d'esters de cholestérols, de phytostérols, de triglycérides, de phospholipides, de vitamines liposolubles et d'acides gras. Les lipides estérifiés sont hydrolysés par les lipases gastriques et pancréatiques (Figure 4). Les lipides hydrolysés et les vitamines liposolubles sont émulsionnés avec les sels biliaires, du cholestérol libre alimentaire ou biliaire, les phospholipides, et les phytostérols pour préparer leur passage aux niveaux des microvillosités intestinales en formant des micelles biliaires complexes (Iqbal and Hussain 2009). Les sels biliaires et le cholestérol libre de la bile proviennent d'une sécrétion par les hépatocytes. Ils sont sécrétés dans le système biliaire par le transporteur *ATP Binding Cassette G5* (ABCG5), *ATP Binding Cassette G8* (ABCG8) et *ATP Binding Cassette B11* (ABCB11) (Yu et al. 2005; Strautnieks et al. 2008). L'internalisation des acides gras au niveau de la bordure en brosse des entérocytes peut se faire par diffusion passive. Cette internalisation peut aussi être facilitée par des transporteurs membranaires, tels que les protéines transports : *Cluster of differentiation 36* (CD36) et le *Fatty Acid Transporter Protein* (FATP) (Febbraio et al. 1999; Pepino et al. 2014). Le cholestérol libre et les phytostérols sont

eux absorbés par les entérocytes à l'aide d'un transporteur de stérols, la protéine *Niemann-Pick C1 like 1* (NPC1L1) (Altmann et al. 2004). Après absorption dans la cellule intestinale, le cholestérol et les phytostérols sont convertis en esters de stérol par l'*acyl-CoA cholesterol acyl transferase* (ACAT). Cependant, les stérols végétaux sont de mauvais substrats pour l'ACAT, ainsi seuls moins de 5 % des phytostérols alimentaires sont absorbés. Les phytostérols non-absorbés sont transportés de la cellule intestinale à la lumière intestinale, grâce aux transporteurs ABCG5 et ABCG8 (Figure 4) (Feingold 2000; Iqbal and Hussain 2009).

Les acides gras et les monoacylglycérols absorbés par les entérocytes sont utilisés pour synthétiser les triglycérides, par l'action de la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) puis la diacylglycérol transférase (DGAT). L'Apo B48 est synthétisée dans le réticulum endoplasmique des entérocytes et est associée aux triglycérides, au cholestérol estérifié par la voie ACAT et les phospholipides grâce à la *microsomal triglyceride transfer protein* (MTTP) pour former les pré-chylomicrons (Feingold 2000; Hussain et al. 2003; Iqbal and Hussain 2009). Ces pré-chylomicrons sont transportés dans l'appareil de Golgi, où ils vont poursuivre leur maturation notamment par glycosylation de l'Apo B48 et par l'enrichissement en apolipoprotéines (Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV). Les chylomicrons matures sont ensuite sécrétés par exocytose dans la circulation lymphatique (Figure 4) (Tso and Balint 1986; Xiao et al. 2019).

Ces chylomicrons voyagent dans la lymphe et passent dans la circulation sanguine par le canal thoracique, ils vont ensuite capter les Apo C (I, II, III) dans le sang. Ces chylomicrons ont pour fonction de transporter les triglycérides vers le tissu adipeux pour être stockés ou vers les muscles pour être utilisés comme substrat énergétique. Pour cela, les triglycérides des chylomicrons sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). La LPL est une enzyme synthétisée au niveau des muscles et du tissu adipeux. Le *lipase maturation factor 1* (LMF1) est essentiel pour la sécrétion de la LPL vers la surface de l'endothélium des capillaires, des cellules musculaires et des adipocytes. Elle est ensuite ancrée au niveau de l'endothélium des capillaires par la *glycophosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein-1* (GPIHBP1) (Beigneux et al. 2007; Fong et al. 2016). La LPL est activée par l'Apo C-II tandis que l'Apo C-III l'inactive et inhibe l'absorption des particules résiduelles. Ainsi, l'activation de la LPL par l'Apo C-II portée par les chylomicrons, induit la formation d'acides gras et de monoacylglycérol suite à l'hydrolyse des triglycérides transporté par ces chylomicrons (Goldberg et al. 1990; McConathy et al. 1992). Les acides

gras libres sont directement absorbés par les adipocytes et les cellules musculaires. Lors de la lipolyse, les chylomicrons se désengorgent de triglycérides et réduisent leur taille formant ainsi des chylomicrons résiduels. Ces chylomicrons résiduels sont déplétés en apolipoprotéines A et C, ainsi qu'en phospholipides. Ces différents composants sont transférés à d'autres lipoprotéines, particulièrement les HDL. Ces chylomicrons résiduels vont s'enrichir en cholestérol (libre et estérifié) ainsi qu'en Apo E. La déplétion en Apo C-II stoppe l'hydrolyse des triglycérides et les particules résiduelles sont éliminées de la circulation par le foie. La présence de cette Apo E est essentielle pour la reconnaissance et la clairance hépatique de ces chylomicrons résiduels. L'Apo E est reconnue par le récepteur au LDL (LDLR) ou d'autres récepteurs comme le *LDL Receptor-related Protein 1* (LRP1) ou les *Heparan Sulfate Proteoglycans* (HSPG), participant ensuite à la dégradation des chylomicrons résiduels (Feingold 2000; Ginsberg et al. 2021).



ABCG5/G8 : ATP-binding cassette transporters G5/G8 ; ACAT : acyl-CoA cholestérol acyltransférase ; AG : Acide gras ; MAG : monoacylglycerol ; CE : cholesterol estérifié ; CM : chylomicron ; CL : cholestérol libre ; CD-36 : Cluster of differentiation 36 ; DGAT : diacylglycerol transférase ; FATP : Fatty Acid Transporter Protein ; LPL : lipoprotéine lipase ; MGAT : monoacylglycérol transférase ; MTP : microsomal triglyceride transfer protein ; NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1 ; TG : triglycéride

**Figure 4. Voie exogène du métabolisme des lipoprotéines (inspirée de (Feingold 2000; Astorga et al. 2022)).**



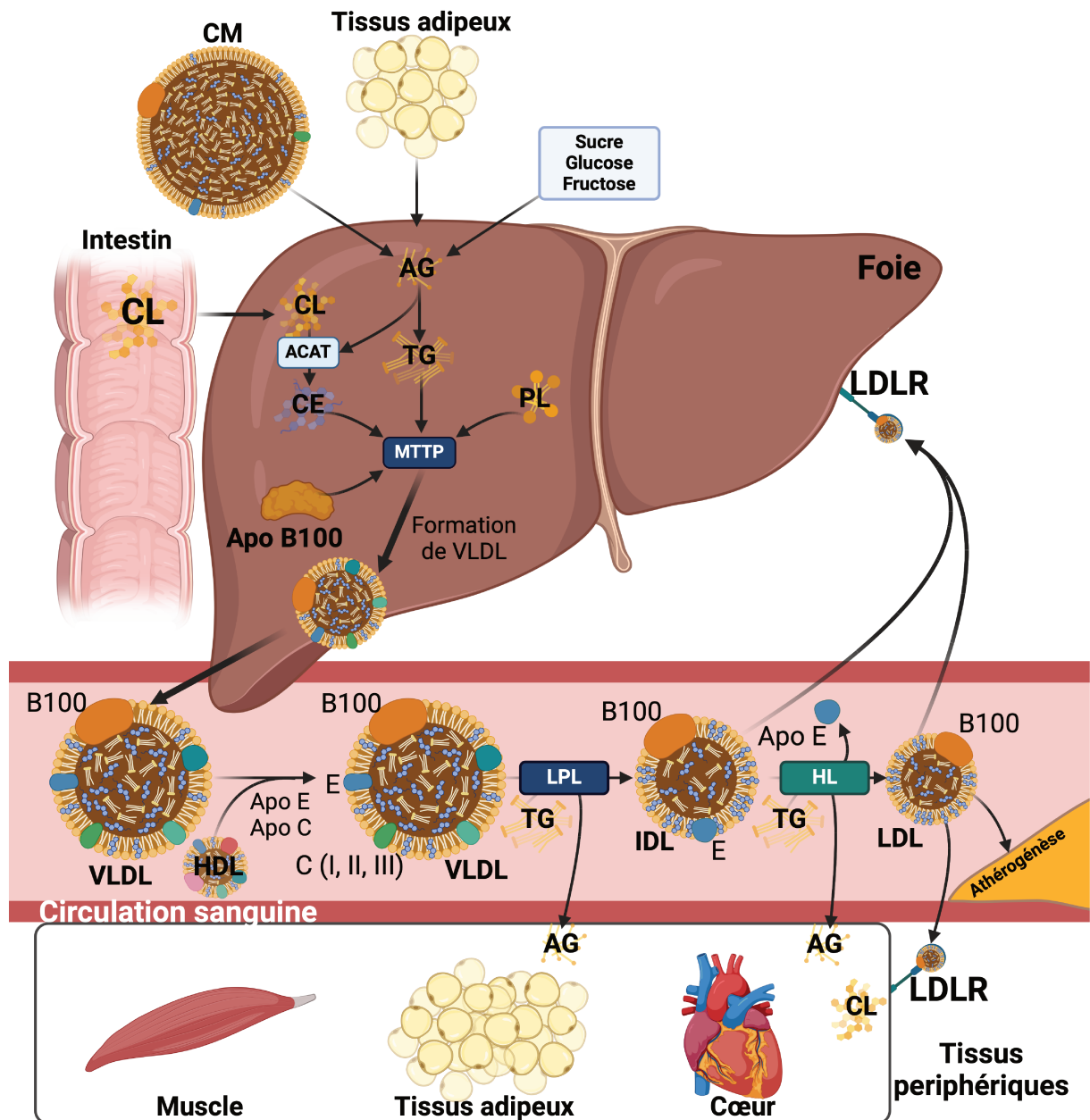
## 2. La voie endogène

En situation post-absorptive, les VLDL remplacent progressivement les chylomicrons en tant que transporteurs principaux des triglycérides dans le sang (**Figure 5**). Les triglycérides d'origine hépatique sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique à partir d'acides gras provenant des chylomicrons rémanents ou des acides gras libres non estérifiés des adipocytes. La biogenèse des VLDL se déroule dans la lumière du réticulum endoplasmique des hépatocytes. L'Apo B100 nouvellement synthétisée se retrouve progressivement enrichie en lipides : en cholestérol, triglycérides, esters de cholestérol et phospholipides par un processus régulé par la MTP (**Rustaeus et al. 1999; Sirwi and Hussain 2018**). Cependant, l'enrichissement en lipides de l'Apo B100 est dépendant de la concentration en triglycérides. Si la concentration en triglycérides est insuffisante, l'Apo B100 est dégradée, entraînant l'arrêt de la synthèse des VLDL (**Figure 5**) (**Fisher et al. 1997; Sirwi and Hussain 2018**).

Les VLDL nouvellement formées sont sécrétées dans la circulation sanguine sous deux formes : VLDL<sub>1</sub> et VLDL<sub>2</sub>. Les VLDL<sub>2</sub> sont des particules pauvres en triglycérides tandis que les VLDL<sub>1</sub> sont des particules riches en triglycérides (**Stillemark-Billton et al. 2005**). Ces VLDL s'enrichissent en esters de cholestérol au cours de leur voyage vers les tissus périphériques, sous l'action de la *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP) et en Apo C et en Apo E à partir des HDL circulant. Au niveau des tissus périphériques, comme les chylomicrons dans la voie exogène, les triglycérides des VLDL sont hydrolysés par la LPL. Les acides gras libérés sont internalisés puis utilisés par les tissus périphériques. L'activité de la LPL est régulée par l'Apo C-II (activateur) et l'Apo C-III (inhibiteur) présents sur les VLDL. Après la lipolyse des triglycérides, les VLDL se transforment en IDL qui sont enrichies en esters de cholestérol et en Apo E captée à partir des HDL. Une fraction des IDL est éliminée par le foie, soit par leur liaison au LDLR via l'Apo B100 ou l'Apo E, soit par leur liaison au LRP via l'Apo E. Les triglycérides de l'autre fraction d'IDL sont, quant à eux, hydrolysés par la lipase hépatique (HL), entraînant la formation des LDL (**Figure 5**) (**Feingold 2000; Ginsberg et al. 2021**).



Les LDL sont des produits du métabolisme des VLDL et sont composées principalement d'esters de cholestérols et d'Apo B100 (**Figure 5**). La particule de LDL est le principal transporteur de cholestérol plasmatique chez l'Homme. La concentration en LDL dans le plasma est modulée par leur clairance hépatique via la liaison des particules à leurs récepteurs spécifiques : LDLR et LRP1. La majorité des LDL est éliminée par le LDLR des hépatocytes via l'Apo B100, le reste des LDL étant absorbé par les tissus périphériques (**Feingold 2000; Tiwari and Siddiqi 2012; Ginsberg et al. 2021**). Le taux des récepteurs hépatiques est régulé par la concentration en cholestérol dans les hépatocytes. Lorsque la concentration en cholestérol est faible, la production de LDLR et l'activité de la HMG-CoA réductase sont activées. L'ensemble de ces processus contribue à l'augmentation de la concentration en cholestérol dans les hépatocytes, notamment via l'HMG-CoA réductase, une enzyme clé dans la synthèse du cholestérol. Cependant, lorsque la concentration en cholestérol hépatique est élevée, ces processus sont inhibés (**Smith et al. 1990; Goldstein and Brown 2009**). Des concentrations élevées en LDL-cholestérol (LDL-C) sont associées à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires (**Feingold 2000; Visseren et al. 2021**).



ACAT : Acyl-coenzyme A : cholestérol acyltransférase ; AG : acide gras ; CL : cholestérol libre ; CE : cholestérol estérifié ; CM : chylomicron ; IDL : intermediate-density lipoprotein ; LDL : low-density lipoprotein ; LDLR : récepteur au LDL ; PL : phospholipide ; VLDL : very low-density lipoprotein ; TG : triglycérides

Figure 5. La voie endogène du métabolisme des lipoprotéines (adaptée de (Feingold 2000; Zwartjes et al. 2021; Ginsberg et al. 2021)).

### 3. Le transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol est le processus par lequel le corps élimine le cholestérol excédentaire des tissus périphériques (muscles, tissus adipeux, et même les macrophages dans les plaques d'athérome) vers le foie. Les principaux transporteurs du cholestérol dans ce processus sont les HDL (**Glomset et al. 1966; Miller et al. 1985**). Cette fonction spécifique aux HDL sera abordée en détail dans [la partie : biogenèse, catabolisme et fonction principale des HDL](#).

#### D. Les apolipoprotéines régulatrices du métabolisme lipidique

Les apolipoprotéines (Apo) sont une famille de protéines qui sont associées aux lipides pour former les lipoprotéines. La structure, la fonction et le devenir métabolique des lipoprotéines sont conférés par ces apolipoprotéines qui sont à leur surface, à l'interface avec le plasma. Ces apolipoprotéines peuvent être classifiées en deux groupes : les apolipoprotéines échangeables et les non-échangeables. Les Apo B (B100 et B48) sont les seules apolipoprotéines non-échangeables et celles-ci circulent donc uniquement liées à leurs lipoprotéines associées. L'Apo B100 est la protéine majoritaire des LDL, VLDL et de la Lp(a) alors que l'Apo B48 est la protéine principale des chylomicrons. Les apolipoprotéines échangeables ont une taille inférieure à celle des Apo B et peuvent être transférées entre les lipoprotéines et capter des lipides lorsqu'elles se retrouvent dans la circulation. Les apolipoprotéines sont également classées en différentes sous-familles et elles présentent des fonctions et des structures différentes (**Tableau 2**) (**Mahley et al. 1984; Utermann 1989; Jonas and Phillips 2008; Dominiczak and Caslake 2011**).

**Tableau 2. Caractéristiques des apolipoprotéines (Mahley et al. 1984; Utermann 1989; Jonas and Phillips 2008; Dominiczak and Caslake 2011).**

Apolipoprotéine	Source	Poids moléculaires (kDa)	Lipoprotéine associées	Fonctions
Apo (a)	Foie	Varie	Lp(a)	Inhibition de l'activité du plasminogène, composition de la Lp(a)
Apo A-I	Foie, intestin	28,1	HDL, CM, VLDL	Structure des HDL, cofacteur de la LCAT
Apo A-II	Foie, intestin	17,4	HDL, CM, VLDL	Structure des HDL, inhibitrice HL
Apo A-IV	Foie, intestin	44,5	HDL, CM	Modulation de l'assemblage et le métabolisme des lipoprotéines riches en TG
Apo A-V	Foie	41,3	CM, VLDL	Module l'activité de la LPL permettant d'accélérer la lipolyse des TG
Apo B100	Liver	550,0	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	Protéine de structure VLDL, IDL, LDL, Lp(a), ligand du récepteur LDL
Apo B48	Intestine	210,0	CM	Protéine de structure des CM
Apo C-I	Foie, intestin	6,6	HDL, CM, VLDL	Activatrice de LCAT, inhibitrice de LPL
Apo C-II	Foie, intestin	9,0	HDL, CM, VLDL	Cofacteur LPL
Apo C-III	Foie, intestin	8,8	HDL, CM, VLDL	Inhibitrice de LPL et de l'élimination des lipoprotéines riches en TG
Apo D	Foie	29,0	HDL	Inconnue
Apo E	Foie, intestin, cerveau, rein, rate	34,0	HDL, CM, IDL, VLDL	Ligand du récepteur aux LDL
Apo J/Clusterin	Foie	70,0	HDL	Liaison des molécules hydrophobes, interaction avec les récepteurs cellulaires
Apo L	Inconnue	39,0	LDL, HDL	Inconnue
Apo M	Foie, rein	26,0	HDL	Liaison de petites molécules hydrophobes

*LCAT : lécithine-cholestérol-acyltransférase ; LPL : lipoprotéine lipase ; TG : triglycérides ; HL : Lipase Hépatique*

Les apolipoprotéines exercent trois fonctions majeures : 1) structuration des lipoprotéines ; 2) transport et redistribution des lipides dans les différents tissus (foie, muscles et tissus adipeux) et 3) rôle de cofacteurs d'enzymes impliqués dans le métabolisme lipidique. Historiquement, les apolipoprotéines étaient classifiées en fonction de leurs séquences et de leurs tailles en six sous-familles qui sont : les Apo A (A-I, A-II, A-IV), les Apo B (B100, B48), Apo C (C-I, C-II, C-III), Apo D, Apo E et Apo J (**Alaupovic 1971, 1996; Mahley et al. 1984; Franceschini 1996; Dominiczak and Caslake 2011**).

## 1. Les apolipoprotéines A

Les apolipoprotéines A sont majoritairement associées aux HDL et participent à leur métabolisme.

**L'apolipoprotéine A-I** constitue la composante structurale majoritaire des HDL humaines et elle correspond à 70% des protéines contenues dans les HDL (**Cheung and Albers 1982; Bryan Brewer et al. 1986**). Cette protéine est également présente très faible en quantité sur les chylomicrons, VLDL et les LDL (**Mahley et al. 1984**). L'Apo A-I est synthétisée par le foie et l'intestin, et sa concentration plasmatique est contrôlée par son taux de dégradation, l'Apo A-I non associée à des lipides étant rapidement dégradée. Elle a plusieurs fonctions comme assurer la structure des HDL, l'activation de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), être le ligand de la protéine *ATP-Binding Cassette Transporter A1* (ABCA1) ainsi qu'exercer des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (**Klimov et al. 1993; Frank and Marcel 2000**). Les taux en apolipoprotéine A-I sont inversement corrélés avec le risque de développement de maladies cardiovasculaires (**Walldius and Jungner 2004**).

**L'apolipoprotéine A-II** est la seconde protéine majoritaire des HDL et elle représente environ 20% de leur contenu protéique (**Brewer et al. 1972; Cheung and Albers 1982**). L'Apo A-II est synthétisée par le foie et l'intestin et elle participe à stabiliser la structure des HDL et à réguler le métabolisme des triglycérides. L'Apo A-II module ce métabolisme notamment en remplaçant l'Apo C-III des VLDL et en inhibant l'activité de la LPL. Elle est également un cofacteur de la LCAT et de la CETP (**Boisfer et al. 1999; Escolà-Gil et al. 2001**). La concentration en Apo A-II est régulée par son taux de production. La concentration en apolipoprotéine A-II est potentiellement inversement corrélée avec le risque de développement de maladie coronarienne (**Walldius and Jungner 2004; Birjmohun et al. 2007**).

**L'apolipoprotéine A-IV** est produite principalement par l'intestin grêle dont la production est stimulée par l'absorption lipidique lors de la prise alimentaire (Kalogeris et al. 1994). En situation postprandiale, l'Apo A-IV est incorporée aux chylomicrons et circule dans la lymphe. Après hydrolyse des chylomicrons dans la circulation, l'Apo A-IV est associée aux HDL et mais elle peut aussi circuler librement, c'est-à-dire sans association avec des lipoprotéines (Green et al. 1980; Ohta et al. 1985; Ghiselli et al. 1988). Elle jouerait également un rôle dans la satiété et régulerait le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (TRL) (VLDL, IDL, LDL) (Fujimoto et al. 1993; Lu et al. 2006; Weinberg et al. 2012). Cette apolipoprotéine présente aussi des propriétés antioxydantes (Qin et al. 1998), améliore l'activité de la LPL en présence d'Apo C-II (Goldberg et al. 1990) et favorise le transport inverse du cholestérol en modulant les activités de la LCAT et de la CETP (Steinmetz and Utermann 1985; Main et al. 1996).

**L'apolipoprotéine A-V** est un régulateur de la concentration en triglycérides plasmatiques (Pennacchio et al. 2001). Cette apolipoprotéine circule dans le plasma associé aux HDL, VLDL et CM. Produite par le foie, elle circule à des concentrations plus basses que les autres apolipoprotéines (O'Brien et al. 2005). L'apolipoprotéine A-V module le métabolisme des TG probablement en agissant sur la LPL et sur la synthèse et la sécrétion des VLDL (Nilsson et al. 2011).

## 2. Les apolipoprotéines B

Les **apolipoprotéines B** sont les apoprotéines des lipoprotéines de basses densités allant des chylomicrons aux VLDL, IDL, LDL et Lp(a) (Fisher and Schumaker 1986; Hardman and Kane 1986; Utermann 1989). L'apolipoprotéine B est codée par un unique gène exprimé dans le foie et l'intestin. La différence étant que chez l'Homme, l'apolipoprotéine B synthétisée par l'intestin (Apo B48) est une protéine dont la taille est approximativement de 48% de celle synthétisée par le foie (Apo B100) (Kane et al. 1980). La taille plus courte de l'Apo B48 est issue de la conversion d'un codon en un codon stop au cours de l'édition de l'ARNm (Young 1990). Une des caractéristiques des Apo B est que chaque particule de lipoprotéine n'en contient qu'une seule molécule.

**L'apolipoprotéine B100** est la composante structurale principale des VLDL, IDL, LDL et Lp(a). L'Apo B100 est un ligand du récepteur aux LDL (LDLR) et exerce un rôle important dans la clairance de ces lipoprotéines. Si L'Apo B100 est produite en excès, elle se retrouve

dégradée au sein même des cellules. De plus, chaque particule de VLDL, IDL, LDL et Lp(a) ne comprend qu'une Apo B100 par particule (Elovson et al. 1988; Dominiczak and Caslake 2011).

**L'apolipoprotéine B48** est la protéine structurale des chylomicrons et des chylomicrons rémanents, contrairement à l'Apo B100, elle n'est pas reconnue par le LDLR. Ainsi, l'internalisation des chylomicrons rémanents est principalement réalisée par le LRP (*lipoprotein-related receptor protein*) et le LDLR via l'Apo E (Mahley et al. 1989; Hussain et al. 1991).

### 3. Les apolipoprotéines C

**Les apolipoprotéines C** se retrouvent à la surface des chylomicrons, VLDL et HDL. Elles sont synthétisées majoritairement par le foie et vont s'échanger dans la circulation sanguine entre les lipoprotéines riches en triglycérides et les HDL (Mahley et al. 1984).

**L'apolipoprotéine C-I** joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipoprotéines. En effet, cette apolipoprotéine est un activateur de la LCAT, un modulateur de la CETP et elle inhibe aussi la liaison aux récepteurs LDLR et *LDL-receptor related protein* (LRP) (Soutar et al. 1975; Weisgraber et al. 1990; Sehayek and Eisenberg 1991; Gautier et al. 2000).

**L'apolipoprotéine C-II** est un cofacteur de l'activation enzymatique de la LPL pour l'hydrolyse des triglycérides des TRL (LaRosa et al. 1970; Shen et al. 2010). Une déficience en Apo C-II causé par une mutation génétique engendre une hypertriglycéridémie causé par une altération de l'élimination des TRL (Breckenridge et al. 1978).

**L'apolipoprotéine C-III** est la plus abondante des Apo C. L'Apo C-III est un régulateur du métabolisme des TRL, car elle inhibe la LPL et la capture des TRL par le foie (McConathy et al. 1992; Clavey et al. 1995). De plus, l'Apo C-III stimulerait l'assemblage et la production de VLDL par le foie. Aussi, la concentration en Apo C-III est corrélée positivement avec la concentration en triglycérides (Cohn et al. 2004). Une perte de fonction de l'Apo C-III engendre une diminution des triglycérides et réduit aussi le risque de maladies cardiovasculaires (Jørgensen et al. 2014). Aussi, l'Apo C-III constitue une véritable cible thérapeutique et un marqueur potentiel des maladies cardiovasculaires.

#### 4. L'apolipoprotéine E

**L'apolipoprotéine E** est une lipocaline et un composant des chylomicrons, VLDL, IDL et HDL (HDL<sub>3</sub>) (Shore and Shore 1973; Mahley et al. 1979). L'Apo E est produite par plusieurs organes, majoritairement par le foie, mais également par les astrocytes du cerveau, le rein, les glandes surrénales ainsi que par les macrophages (Basu et al. 1982; Blue et al. 1983). Lorsqu'elle est sécrétée, l'Apo E est soit associée aux lipoprotéines ou à des disques de phospholipides localisée dans le fluide interstitiel, la lymphe et le plasma où sa concentration est plus abondante mais aussi dans le fluide cérébrospinal (Huang and Mahley 2014). L'Apo E joue un rôle important dans le transport des lipides entre les cellules des différents organes grâce à son interaction avec le LDLR, le LRP et les HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglycans*) (Mahley 1988; Ji et al. 1994). En plus d'être ubiquitaire, cette apolipoprotéine possède des propriétés pléiotropes. Elle contribue, en effet, à la clairance des TRL, à l'efflux du cholestérol avec l'Apo A-I et a des propriétés anti-athérogènes, antioxydantes ainsi que modulatrices de la réponse inflammatoire (Mahley et al. 1979; Chroni et al. 2005; Ulrich et al. 2014). L'apolipoprotéine E est une protéine polymorphe existant sous trois isoformes : l'Apo E2, E3 et E4. Ces différentes isoformes d'Apo E n'ont pas la même affinité avec les différents récepteurs (Utermann 1987; Weisgraber 1994). De plus, ces trois isoformes forment six combinaisons différentes de phénotypes. La combinaison homozygote pour l'Apo E2 peut être associée à une dysbétalipoprotéïnémie étroitement liée à un risque élevé de maladie coronarienne (Brewer et al. 1983; Utermann 1987). L'Apo E4 représente aussi un facteur de risque accru de développement de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Yamazaki et al. 2019).



## 5. L'apolipoprotéine (a)

**L'apolipoprotéine (a)** ou Apo (a) est produite par le foie et est transportée par la Lp(a) dans le sang. La Lp(a) est une lipoprotéine similaire aux LDL avec pour seule différence la présence d'une unique apolipoprotéine (a) couplé à l'Apo B100 par un pont disulfure (**Berg 1963; Utermann 1989**). Le gène codant pour l'Apo (a), le *LPA*, présente une homologie de séquence élevée avec celui du plasminogène (**McLean et al. 1987**). Cette apolipoprotéine est une grosse glycoprotéine avec un polymorphisme structural important. Elle est composée de structures en forme de boucle nommées "Kringles" et d'un domaine peptidase non-fonctionnel (S1). Au sein de l'Apo (a), il existe 10 sous-types de KIV (Kringle IV), nommés KIV<sub>1</sub> à KIV<sub>10</sub> et un type de KV (Kringle V). Son polymorphisme structural s'explique par la réplication contrôlée génétiquement d'un unique sous-type de KIV, le KIV<sub>2</sub>, allant de 1 à 40 copies, ainsi son poids moléculaire varie entre 300 et 800 kDa (**Utermann 1989; Reyes-Soffer et al. 2022**). Les concentrations élevées d'Apo (a) et de Lp(a) sont fortement associées à un risque élevé de développer des maladies cardiovasculaires (**Reyes-Soffer et al. 2022**).

## **II. Focus sur les Lipoprotéines de Haute Densité (HDL)**

Les HDL sont des lipoprotéines sécrétées principalement par le foie et l'intestin. Elles ont pour fonction principale le transport inverse du cholestérol. Ces HDL sont remodelées au cours de leur métabolisme, leur conférant une structure très hétérogène tant par leur forme, leur taille que leur composition. Ces HDL sont pléiotropes en plus de leur fonction principale de transport inverse du cholestérol car elles présentent de nombreuses propriétés vasculo-protectrices. Cependant, en situation d'inflammation, ces nanoparticules peuvent être modifiées. Dans les prochaines parties, nous aborderons tout d'abord, la biogenèse, le remodelage et le catabolisme des HDL au cours du transport inverse du cholestérol. Nous explorerons ensuite l'hétérogénéité de la structure de ces nanoparticules. Enfin, nous détaillerons les altérations causées sur les HDL dans les différentes pathologies.

## A. Biogenèse, remodelage et catabolisme des HDL

### 1. Biogenèse des HDL

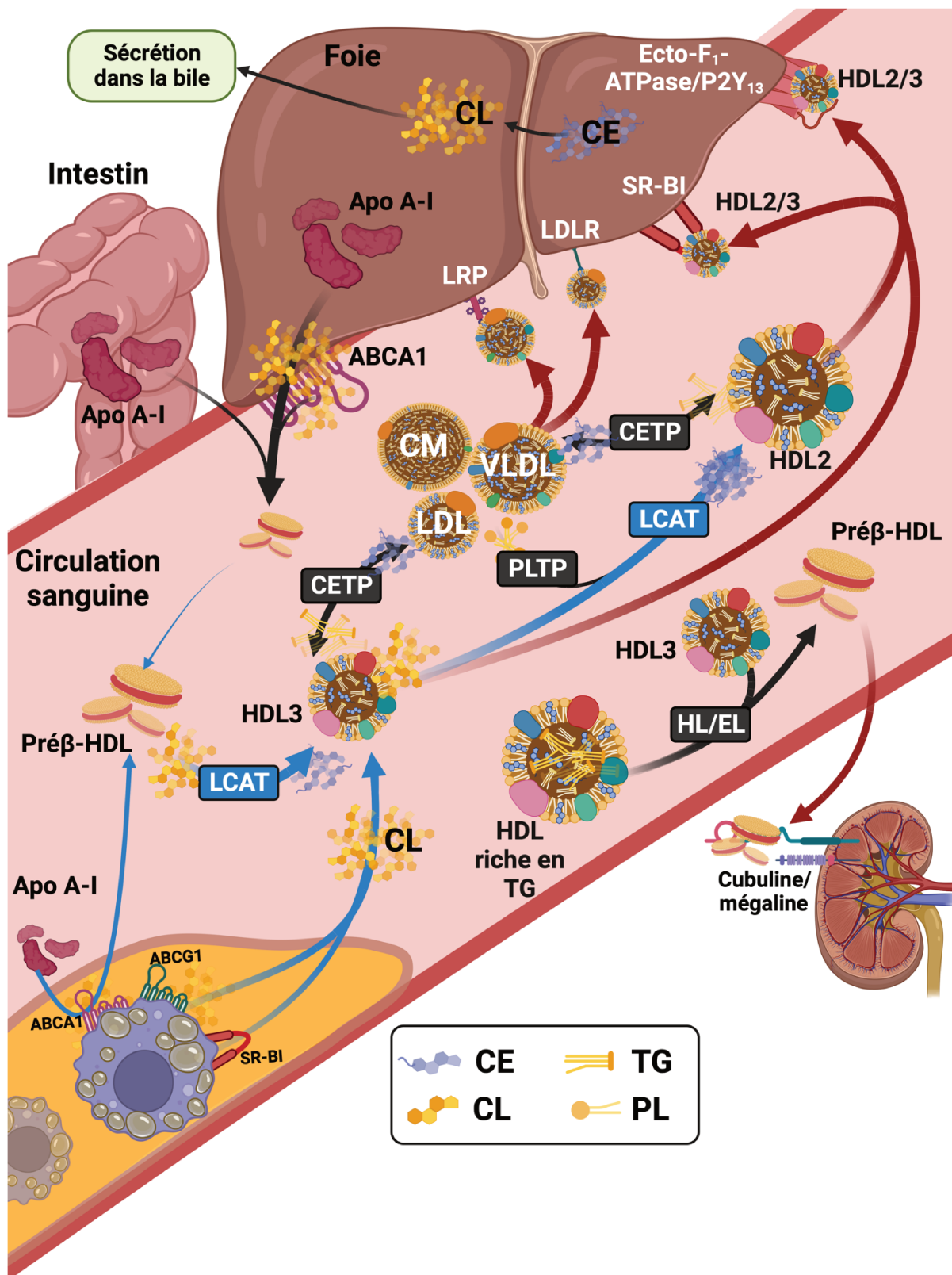


Figure 6. Biogenèse, remodelage et catabolisme des HDL (inspirée de (Feingold 2000; Rye et al. 2009; Kontush and Chapman 2011; Kontush et al. 2015)).

La formation des HDL est la première étape du transport inverse du cholestérol, qui commence par la sécrétion d'Apo A-I sans lipide ou avec peu de phospholipides par le foie et l'intestin (Figure 6) (Hamilton et al. 1976; Zannis et al. 1985). L'Apo A-I interagit ensuite avec le transporteur ABCA1 des hépatocytes ou des entérocytes, ce qui entraîne un enrichissement en cholestérol libre et phospholipides intracellulaire de cette lipoprotéine naissante. Ces lipides sont transportés de l'intérieur des cellules vers l'Apo A-I via le canal d'ABCA1. Cet enrichissement lipidique de l'Apo A-I conduit à la formation de HDL discoïdales, également appelées **préβ-HDL**. Ces préβ-HDL et l'Apo A-I libre peuvent avoir d'autres origines comme le **catabolisme des grosses HDL**. Les **préβ-HDL** peuvent également provenir d'une captation des phospholipides, du cholestérol libre issus de la lipolyse des TRL par l'Apo A-I libre circulante (Patsch et al. 1978; Vélez-Carrasco et al. 1999). Ce processus explique la concentration basse en HDL que l'on rencontre dans la maladie de Tangier, du fait de la mutation perte de fonction sur le gène *ABCA1*. Cette maladie se caractérise par l'impossibilité de lipider l'Apo A-I via ABCA1, entraînant alors son catabolisme (Brooks-Wilson et al. 1999; Rust et al. 1999; Wang et al. 2000a).

**ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)** fait partie de la famille des transporteurs ABC. ABCA1 est exprimée dans divers tissus et abondamment dans les macrophages et les hépatocytes. Dans le métabolisme des HDL, l'activation d'ABCA1 favorise le transport des phospholipides et du cholestérol libre provenant de la membrane plasmique de ces cellules vers l'Apo A-I pour former les préβ-HDL. ABCA1 interagit uniquement avec les préβ-HDL ou l'Apo A-I libre. Une mutation perte de fonction d'ABCA1, provoque la maladie de Tangier, caractérisée par des niveaux bas en HDL-C, des dépôts de cholestérol dans les macrophages à l'origine du développement de l'athérosclérose. Les voies *Liver X Receptors* (LXR) et *Retinoid X Receptors* (RXRs) jouent un rôle clé dans l'expression d'ABCA1. En effet, l'activation de LXR entraîne une augmentation de la formation de HDL modulée par ABCA1 accélérant ainsi l'efflux du cholestérol vers l'Apo A-I (Wang et al. 2000b; Remaley et al. 2001; Kielar et al. 2001; Phillips 2018). Les *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs)  $\alpha$  and  $\gamma$  contribue également à la biogenèse des HDL par l'activation d'ABCA1 (Chawla et al. 2001; Li and Glass 2004).

Les préβ-HDL formées entrent rapidement dans un processus de maturation en **HDL sphérique ( $\alpha$ -HDL)**, aussi appelée **HDL<sub>3</sub>**, sous l'action de la LCAT, une enzyme activée notamment par l'Apo A-I. Lorsque la LCAT est activée, elle interagit avec la phosphatidylcholine et le cholestérol libre pour former respectivement des lysophosphatidylcholines (LPC) et des esters de cholestérol (Fielding et al. 1972). Les esters de cholestérol se déplacent dans le cœur lipidique des HDL formant les HDL sphériques de petite taille (HDL<sub>3</sub>, environ 7,2 - 8,8 nm, densité 1,063-1,125 g/mL). Les lysophosphatidylcholines, quant à elles, quittent la membrane des HDL pour se lier à

l'albumine où elles sont recyclées par la LCAT en phosphatidylcholine (Glomset et al. 1966; Fielding et al. 1972; Subbaiah et al. 1980; Nichols et al. 1985).

## 2. Remodelage et catabolisme des HDL

Après leur synthèse par le foie et les intestins, les HDL sont remodelées par de nombreux facteurs avant d'être catabolisées par leurs récepteurs et d'autres protéines plasmatiques. Les HDL sphériques (HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>) sont la forme plus abondante dans le plasma. Ces particules sont de véritables entités dynamiques, continuellement remodelées, conduisant à l'apparition de sous-populations distinctes en fonction de leur taille, leur forme et leur composition en lipides et protéines. Le remodelage complexe des HDL s'accomplit par plusieurs mécanismes.

**La voie ABCG1/SR-B1** - Les lipides sont intégrés aux préβ-HDL via le transporteur ABCA1. Cependant, ABCA1 ne parvient pas à poursuivre l'enrichissement en lipides des HDL dès lors que ces dernières deviennent matures (HDL<sub>3</sub> et HDL<sub>2</sub>) (Figure 7). Ainsi, le transporteur de cholestérol *ATP Binding Cassette Transporter G1* (ABCG1) joue un rôle important dans la suite de l'enrichissement en lipides des HDL. En effet, ABCG1 facilite préférentiellement l'intégration du cholestérol libre et des phospholipides dans les HDL sphériques (HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>). Ce transporteur est exprimé par diverses cellules, notamment les macrophages et les cellules endothéliales (Wang et al. 2004, 2006). De plus, ABCA1 et ABCG1 présentent de nombreuses similitudes comme leur localisation cellulaire. Aussi, ces deux transporteurs peuvent agir en synergie sur l'efflux du cholestérol des tissus périphériques vers les HDL, partant d'une Apo A-I peu lipidée à des HDL sphériques (Gelissen et al. 2006). ABCA1 et ABCG1 peuvent aussi permettre l'efflux du cholestérol de façon indépendante. De plus, ABCG1 permet aussi l'efflux d'un large spectre de stérols vers les HDL comme notamment les oxystérols des cellules spumeuses (Terasaka et al. 2008). Ainsi, l'enrichissement en lipides des HDL sphériques par ABCG1, contribue à l'augmentation de leur taille. Les HDL peuvent ensuite interagir avec le *Scavenger Receptor-B1* (SR-B1) pour s'enrichir en cholestérol libre provenant notamment des macrophages (Figure 7) (Lorenzi et al. 2008; Larrede et al. 2009).

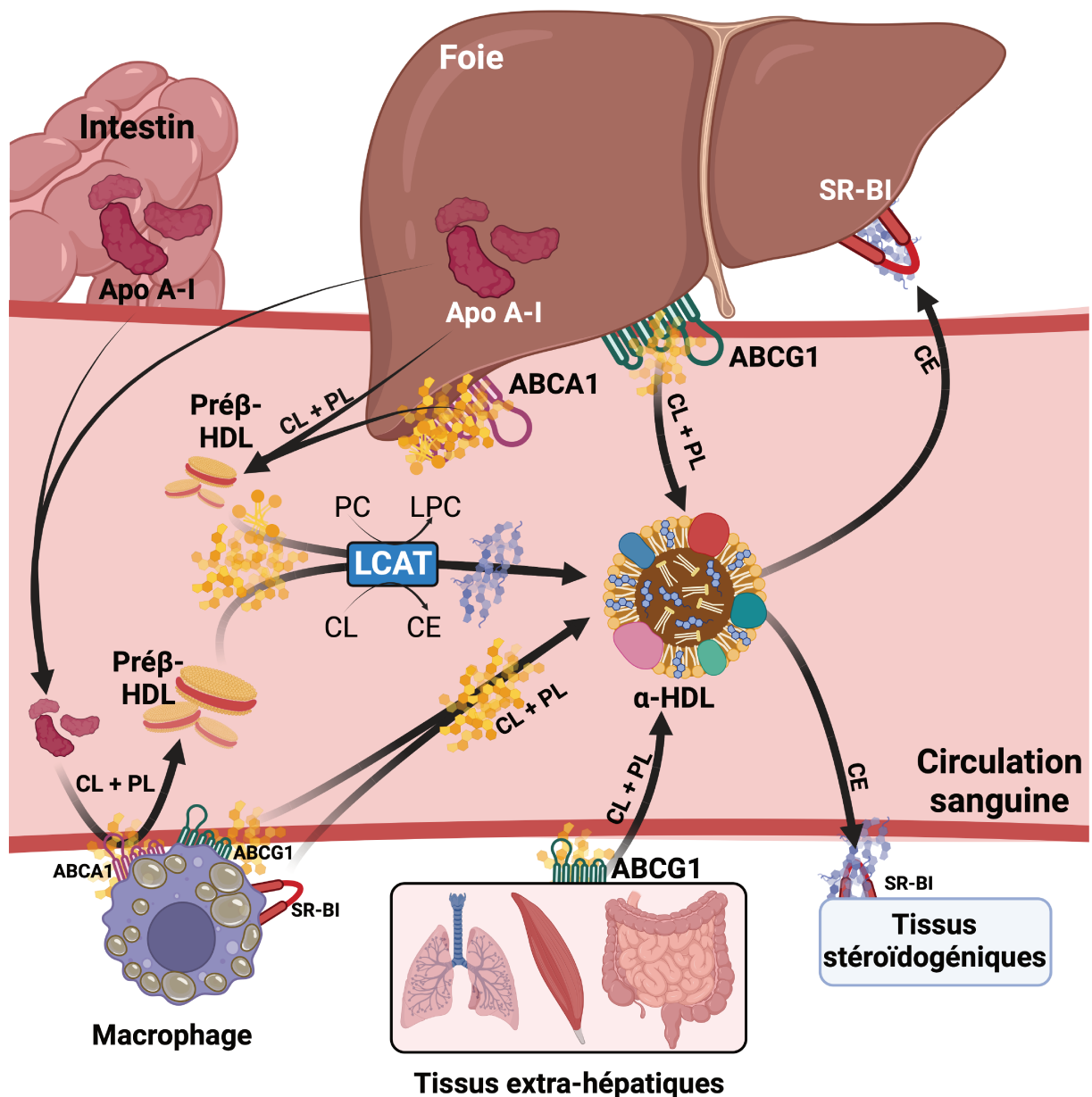
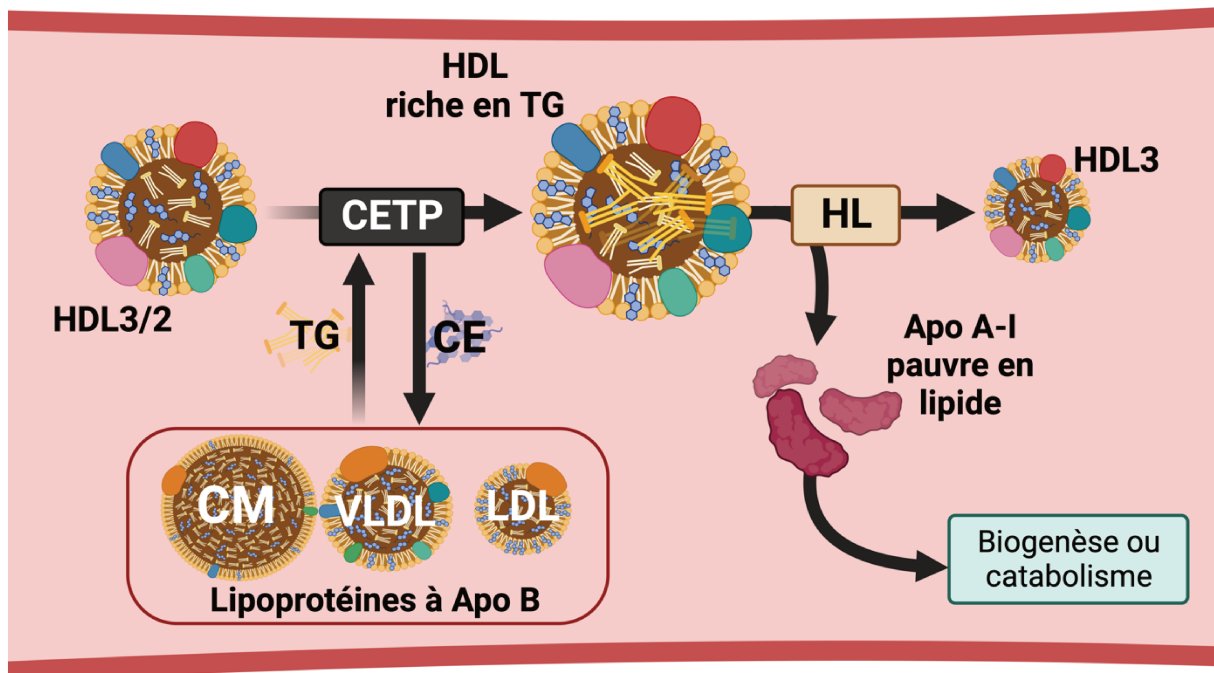


Figure 7. Remodelage des HDL par la voie ABCG1/SR-B1 (inspirée de (Baker et al. 1999; Kontush et al. 2015)).

**ATP Binding Cassette Transporter-G1 (ABCG1)** est un membre de la famille des transporteurs ABC. ABCG1 est localisé dans de nombreux tissus notamment les macrophages. L'interaction d'ABCG1 avec les HDL dépend de leurs degrés de lipodation. C'est pourquoi, il interagit préférentiellement avec les HDL sphériques. L'expression de ABCG1 par les macrophages est modulée par le Liver X Receptor (LXR). L'activation de LXR induit une augmentation de l'expression d'ABCG1 et accélère l'efflux du cholestérol vers les HDL (Wang et al. 2004, 2006; Gelissen et al. 2006). Comme pour ABCA1, RXR et PPARs sont impliqués dans l'activation de l'expression d'ABCG1 dans les macrophages (Chawla et al. 2001; Rader 2006).

**Remodelage par la CETP** – Dans la circulation sanguine, les HDL sphériques (HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>) échangent des esters de cholestérol avec les chylomicrons, les VLDL et les LDL contre des triglycérides (**Figure 8**). Ce processus est régulé par la *Cholesteryl Ester Transfer Protein* (CETP) activée par l'Apo C-I. Le transfert du cholestérol estérifié, conduit à une réduction de la taille des HDL, à un enrichissement en triglycérides et entraîne la formation de nouveaux esters de cholestérol par la LCAT (**Rye et al. 1995; Oliveira et al. 1997**). Les esters de cholestérol transférés aux lipoprotéines à Apo B par la CETP représentent près de 66% des esters de cholestérol transportés vers le foie (**Rye et al. 1995; Barter et al. 2003**). Ces HDL<sub>3</sub> pourront de nouveau être remodelées ou éliminées par le foie.

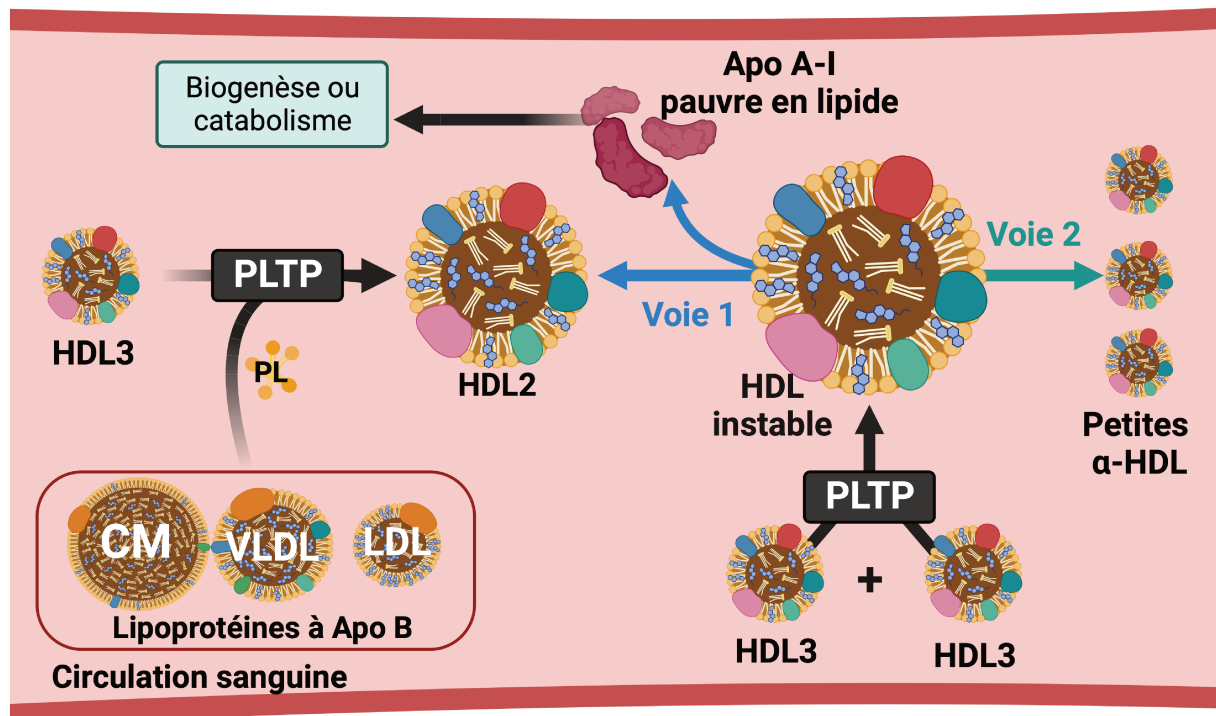


**Figure 8. Voie de remodelage des HDL par la CETP (inspirée de (Baker et al. 1999; Kontush et al. 2015)).**

**Remodelage par la PLTP** – Les HDL captent les phospholipides au cours de la lipolyse des TRL facilitée par la *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) conduisant à la formation de grosses HDL, appelées HDL<sub>2</sub> (**Figure 6**) (**Tall et al. 1985**). La PLTP induit aussi la fusion de petites HDL, ce qui conduit à la formation de grosses particules d'HDL instables. Ces grosses HDL instables peuvent suivre deux voies : soit elles se fragmentent en petites HDL, soit elles libèrent une molécule d'Apo A-I pauvre en lipides (**Lusa et al. 1996; Settasatian et al. 2001; Vikstedt et al. 2007**). La libération en Apo A-I pauvre en lipides causée par la fusion des petites HDL par la PLTP, favorise l'efflux du cholestérol des macrophages via cette Apo A-I (**Vikstedt et al. 2007**). Bien que la PLTP n'ait pas d'activité propre de transfert des esters de cholestérols, celle-ci semble favoriser le transfert des esters de cholestérol, par la CETP, entre les HDL<sub>3</sub> et les VLDL (**Figure 9**) (**Tollefson et al. 1988;**



**Kawano et al. 2000**). Une hypothèse serait que la CETP et la PLTP fonctionnent en synergie pour remodeler les grosses HDL instables en particules plus petites et génèrent ainsi des préβ-HDL stimulant davantage l'efflux du cholestérol.



**Figure 9. Voies de remodelage des HDL par la PLTP (inspirée de (Baker et al. 1999; Kontush et al. 2015)).**

**Remodelage par les lipases hépatique et endothéliale** - La lipase hépatique (HL) et la lipase endothéliale (EL) jouent un rôle important dans le métabolisme des HDL. La lipase hépatique exerce une forte activité lipase des triglycérides et une faible activité phospholipase, tandis que l'EL présente une faible activité lipase des triglycérides et une forte activité phospholipase (Jaye et al. 1999). Ces deux lipases ciblent les HDL enrichies en triglycérides issus de l'activité de la CETP. La lipase hépatique transforme les grosses particules de HDL en petites et en Apo A-I pauvre en lipides, alors que la lipase endothéliale transforme uniquement les grosses HDL en petites HDL (Figure 10) (Clay et al. 1992; Jahangiri et al. 2005). Une autre voie est proposée concernant l'action de l'EL sur les grosses HDL. L'EL peut hydrolyser les phospholipides des HDL, l rendant ces lipoprotéines instables et libérant ainsi une molécule d'Apo A-I rapidement éliminée par les reins (Maugeais et al. 2003; Nijstad et al. 2009). Ces observations faites *in vitro* ont été confirmées *in vivo* chez des patients souffrant d'une déficience en HL et présentant des concentrations élevées en HDL-C et en HDL<sub>2</sub> (Breckenridge et al. 1978; Johannsen et al. 2009). Les patients ayant un déficit en EL présentent eux aussi des concentrations élevées en HDL-C et en grosses HDL (Edmondson et al. 2009; Khetarpal et al. 2021).



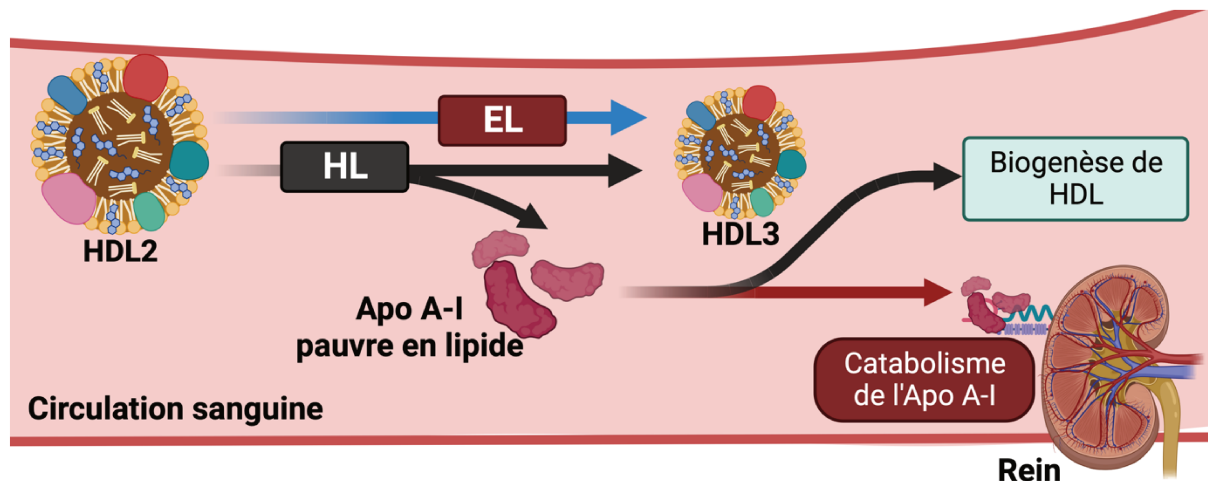


Figure 10. Voies de remodelage des HDL par la HL/EL (inspirée de (Baker et al. 1999; Kontush et al. 2015)).

**La lipase hépatique (HL)** est synthétisée par les hépatocytes et sécrétée dans la circulation sanguine où elle se lie à la surface cellulaire des hépatocytes et de l'endothélium hépatique. La lipase hépatique est déplacée des hépatocytes par les HDL, permettant à l'enzyme de réaliser son activité (Rouhani et al. 2008). Cette lipase catalyse l'hydrolyse des phospholipides et des diacylglycérols à la surface des HDL, et dans une moindre mesure les triglycérides (Coffill et al. 1997; Duong et al. 2003). Ainsi, l'HL, par l'hydrolyse des HDL, contribue à la réduction des concentrations circulantes en HDL et à la clairance de l'Apo A-I par les reins. Son activité lipase est inhibée par les Apo C-I, C-III et par l'Apo A-II (Jahn et al. 1983; Clay et al. 1992; Rouhani et al. 2008).

**La lipase endothéliale (EL)** est synthétisée par divers tissus et cellules, notamment les cellules endothéliales et le foie. Elle hydrolyse les phospholipides et les triglycérides, préférentiellement ceux des HDL (Jaye et al. 1999). L'activité de cette lipase provoque une réduction des concentrations de HDL circulantes. L'expression de la lipase endothéliale est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires comme le *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), tandis que l'Apo A-II inhibe l'activité de l'EL (Jaye et al. 1999; Hirata et al. 2000; Kojma et al. 2004). Une déficience en lipase hépatique, en EL seule ou simultanément en HL et EL, induit une augmentation des concentrations en HDL-C mais ces déficiences n'améliorent pas le transport inverse du cholestérol (Brown et al. 2010).

### 3. Catabolisme des HDL

Le cholestérol issu des HDL est principalement éliminé par le foie sous forme de sels biliaires sécrétés dans la bile. Une partie du cholestérol des HDL est transportée aux cellules des tissus stéroïdogéniques par SR-B1 afin d'être utilisés pour la synthèse de stéroïdes hormonaux (Botham and Bravo 1995; Dijkers and Tietge 2010; Shen et al. 2018). Une seconde voie d'excrétion du cholestérol passerait directement par l'intestin, sans passer par la voie biliaire, il s'agit de la voie d'excrétion *trans* intestinale du cholestérol (TICE) (Stanley et al. 1959; Le May et al. 2013; Grefhorst et al. 2019).

Au niveau des hépatocytes, les HDL interagissent avec **SR-B1**. La fonction principale de SR-B1 est l'absorption des esters de cholestérol des HDL par les hépatocytes afin d'être excrétés dans la bile. Au cours de cette absorption sélective, ces HDL sont converties en pré $\beta$ -HDL (Acton et al. 1996; Stangl et al. 1999; Shen et al. 2018). Ces pré $\beta$ -HDL pourront de nouveau participer au transport inverse du cholestérol ou être catabolisées. Cependant, la majeure partie des esters de cholestérol est épurée par le LDLR au niveau du foie. Cette clairance est réalisée par le transfert des esters de cholestérol des HDL aux lipoprotéines à Apo B100 par la CETP, et aussi par l'élimination des HDL riches en triglycérides portant l'Apo E (Funke et al. 1984; Rye et al. 1995; Barter et al. 2003).

**Scavenger Receptor Binding-1 (SR-B1)** est le récepteur au HDL. Il est exprimé dans le foie et les tissus stéroïdogéniques. Ce récepteur favorise le flux bidirectionnel du cholestérol entre les membranes cellulaires et les lipoprotéines en fonction d'un gradient de concentration. SR-B1 interagit préférentiellement avec les particules de HDL les plus grosses. De plus, après son interaction avec les HDL, SR-B1 libèrent des pré $\beta$ -HDL. Ces pré $\beta$ -HDL sont catabolisées ou retournent dans le cycle de biogenèse des HDL. Ainsi, l'activité et les concentrations de SR-B1 modulent le métabolisme des HDL. Une déplétion en SR-B1 induit une augmentation des niveaux de HDL-C et paradoxalement une augmentation de l'athérosclérose et inversement, lorsque SR-B1 est surexprimé (Acton et al. 1996; Kozarsky et al. 1997; Varban et al. 1998).

Une autre voie d'élimination des HDL existe au niveau hépatique. Celle-ci est basée sur l'interaction de l'Apo A-I avec une protéine de liaison, l'**Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase**. Cette protéine de liaison, localisée sur la membrane des hépatocytes, hydrolyse l'ATP en ADP libérant un phosphate (Martinez et al. 2003; Jacquet et al. 2005). Lorsque l'Apo A-I se lie à l'Ecto-F<sub>1</sub>-ATPase, elle augmente la production d'ADP qui en se liant à son récepteur purinergique, le **P2Y<sub>13</sub>** entraîne l'endocytose de l'*holo*-particule d'HDL par les hépatocytes (Martinez et al. 2003, 2015; Jacquet et al. 2005).

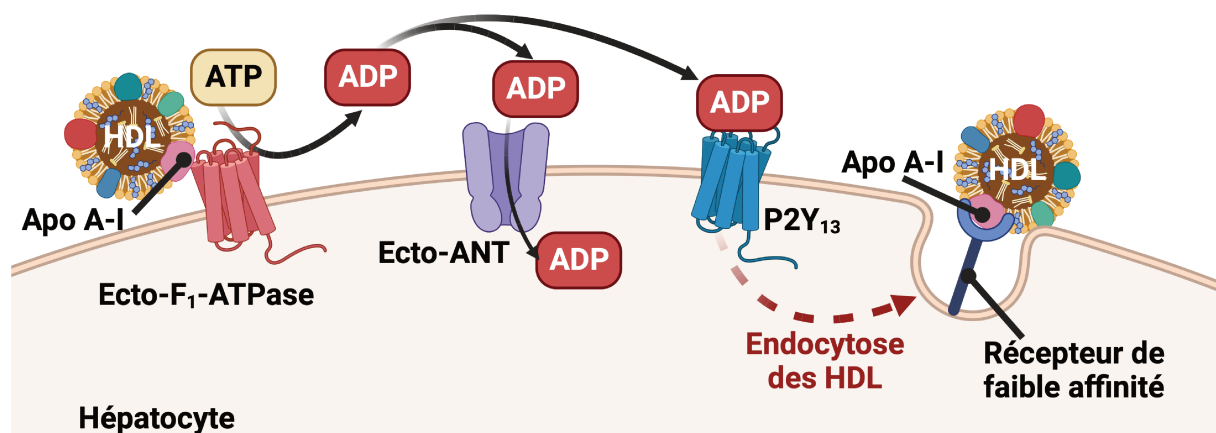


Figure 11. Voie d'endocytose des HDL régulée par la F<sub>1</sub>-ATPase sur les hépatocytes (inspirée de (Cardouat et al. 2017)).

Les reins participent aussi, dans une moindre mesure au catabolisme des HDL. Les HDL sphériques ne passeront pas par la barrière glomérulaire. Ainsi, seules les Apo A-I, Apo A-II et Apo A-IV sans lipide et les pré $\beta$ -HDL traversent la barrière de filtration glomérulaire (Graversen et al. 2008). Une fois dans les cellules tubulaires proximales, les pré $\beta$ -HDL et les Apo sans lipide se lient à un complexe récepteur membranaire, la **cubiline/amnionless**, puis sont captées par endocytose. L'endocytose des HDL par la cubiline est accélérée par un autre récepteur la **mégaline**. La cubiline et la mégaline fonctionnent en synergie pour moduler l'endocytose des HDL (Kozyraki et al. 1999; Hammad et al. 2000; Barth and Argraves 2001; Graversen et al. 2008). Après endocytose, les pré $\beta$ -HDL et les Apo subissent une dégradation lysosomale ou une réabsorption dans la circulation.

Nous avons pu voir qu'au cours du métabolisme des HDL, la structure de ces nanoparticules est fortement hétérogène avec un remodelage tout au long de leur vie.

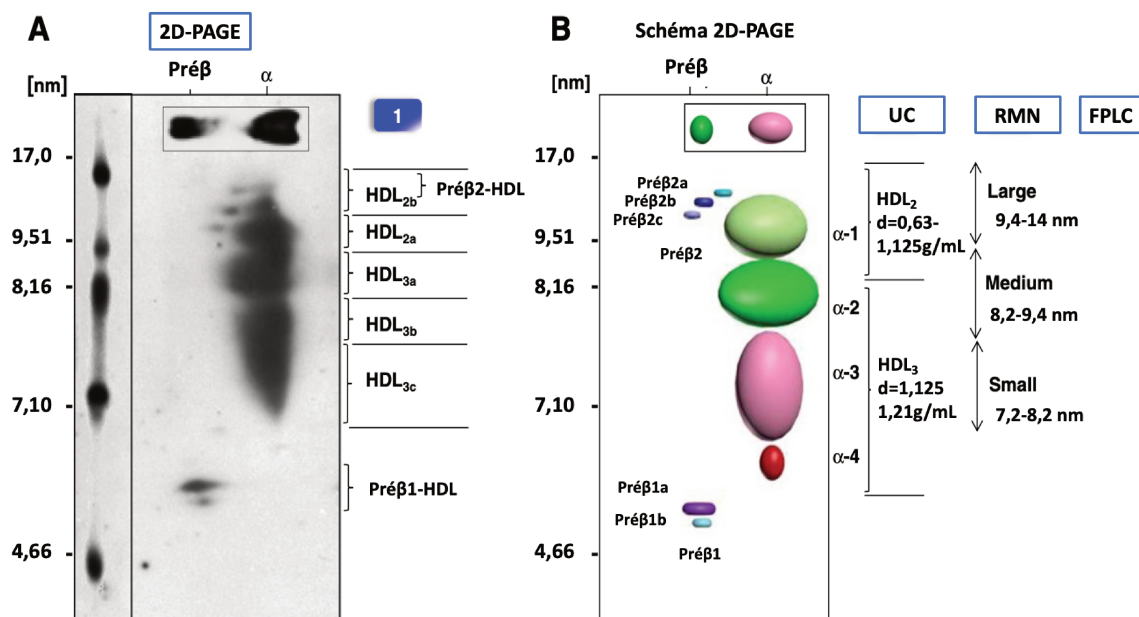
## B. L'hétérogénéité de la structure des HDL

Les HDL, comme les autres lipoprotéines, comprennent un cœur hydrophobe composé de lipides neutres, entouré par une enveloppe amphiphile composée de lipides polaires et de protéines structurales et fonctionnelles. Ces lipoprotéines sont de petite taille, denses et riches en protéines comparées aux autres lipoprotéines. Les HDL présentent une densité allant de 1,063 à 1,21 et une taille moyenne comprise entre 8-10 nm. Les particules de HDL se présentent sous plusieurs formes : discoïdale ou sphérique. La concentration en HDL-C est inversement proportionnelle à l'incidence des maladies cardiovasculaires (Wilson et al. 1988).

Les HDL présentent une importante hétérogénéité tant au niveau de leur taille, leur densité, leur forme que leur composition lipidique et protéique.

### 1. La classification des sous-populations de HDL

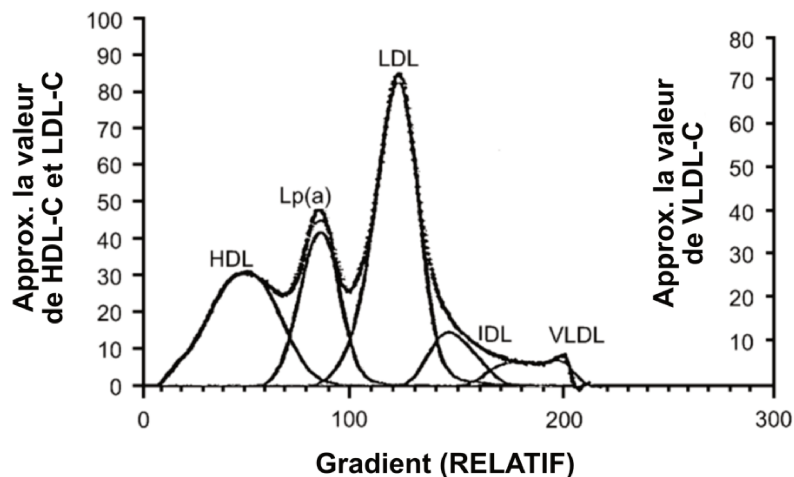
Les différentes sous-populations de HDL ont été identifiées en premier par rapport à leur différence physique : taille, densité et forme. Ces différences ont pu être mises en avant par différentes méthodes de séparation notamment l'ultracentrifugation, la migration sur gel électrophorétique et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Figure 12).



2D-PAGE : électrophorèse bidimensionnelle sur gel gradient de polyacrylamide ; FPLC : chromatographie liquide rapide des protéines ; RMN : Résonance Magnétique Nucléaire ; UC : ultracentrifugation

**Figure 12. Hétérogénéité des sous-populations de HDL en fonction des techniques de séparations (adaptée de (Hafiane and Genest 2015)).**

L'ultracentrifugation analytique est la première méthode qui a permis d'isoler les différentes sous-populations de lipoprotéines et elle a été mise en place par l'équipe de Gofman (Figure 12) (Gofman et al. 1949; Delalla et al. 1954). Lors de cette ultracentrifugation, trois sous-populations de HDL avec des densités différentes ont été observées : les HDL<sub>1</sub> (d=1,05), HDL<sub>2</sub> (d=1,075) et les HDL<sub>3</sub> (d=1,145). Les HDL<sub>1</sub> sont les plus grosses et les moins abondantes voire indétectables, alors que les HDL<sub>3</sub> sont les plus petites et les plus abondantes. À partir de ces études, la densité des HDL a été déterminée entre 1,063 et 1,21 et l'isolement des deux principales sous-populations de HDL, les HDL<sub>2</sub> (d=1,063 – 1,125) et les HDL<sub>3</sub> (d=1,125 – 1,21) a été établi par ultracentrifugation séquentielle par flottaison (Gofman et al. 1949; Lindgren et al. 1951; Delalla et al. 1954). Les HDL<sub>2</sub> étant les plus légères, les plus grosses (9 – 10 nm) et les plus riches en lipide, tandis que les HDL<sub>3</sub> sont denses, petites (8 – 9 nm) et plutôt riches en protéines (Anderson et al. 1978; Chapman et al. 1981). Les différentes sous-populations de HDL peuvent être aussi isolées et mesurées par une autre technique d'ultracentrifugation qui est l'ultracentrifugation sur un rotor fixe vertical inversé (Chung et al. 1980; Kulkarni 2006).



**Figure 13. Profil du cholestérol par *Verticale Auto Profile* (adaptée de (Kulkarni 2006)).**

L'ultracentrifugation à rotor vertical inversé est une technique qui utilise un rotor vertical fixe où les tubes à ultracentrifuger sont positionnés. Dans ce processus, les lipoprotéines se séparent le long de l'axe horizontal du tube, qui reste perpendiculaire au sol pendant la centrifugation. Cette approche diffère d'une ultracentrifugation classique avec un rotor équipé des godets oscillants, où le tube bascule et s'aligne parallèlement au sol durant l'ultracentrifugation.

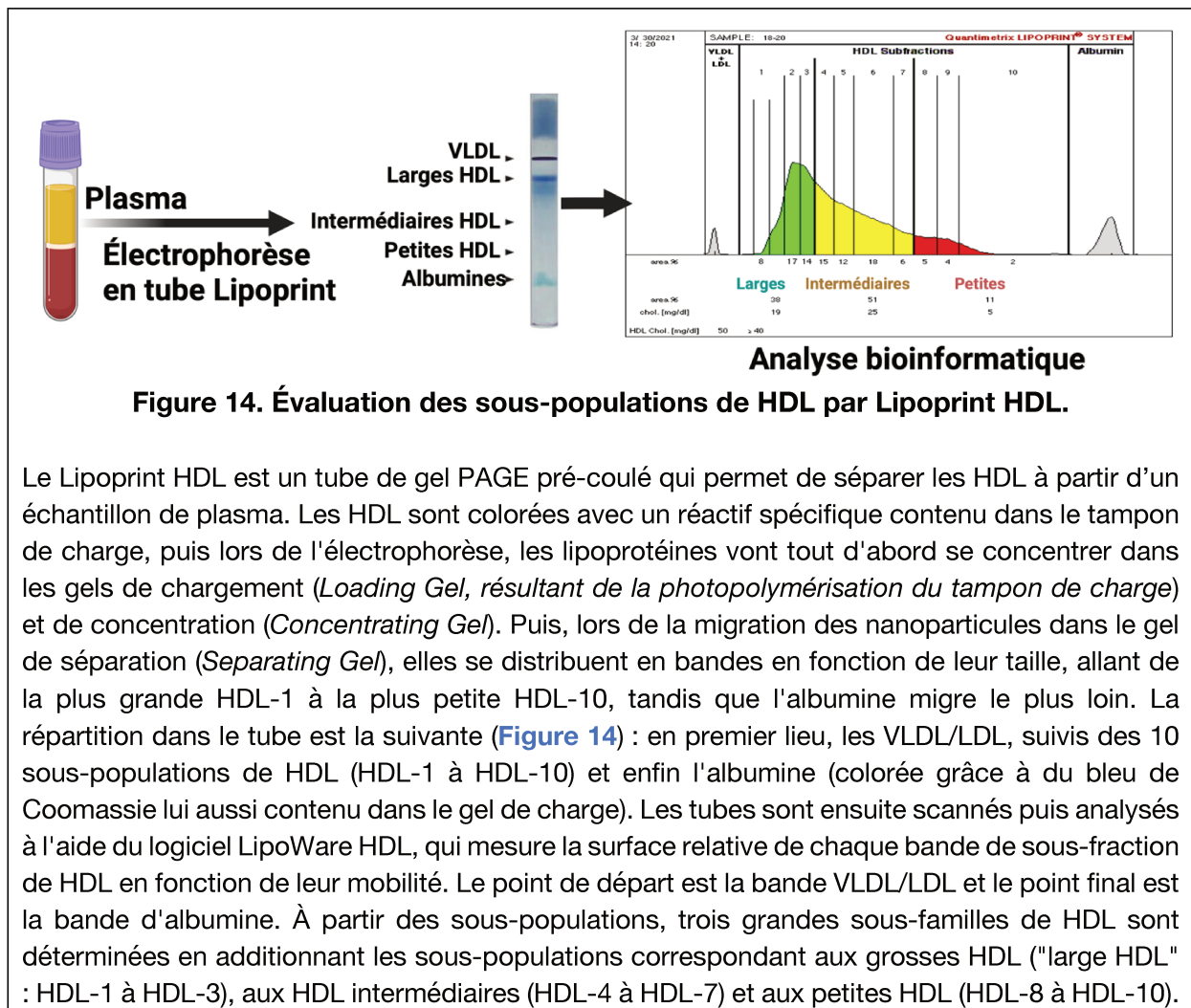
À l'intérieur du tube, une solution de KBr de densité 1,006 est déposée en premier lieu. Ensuite, une quantité connue de sérum alourdi à une densité de 1,21 est ensuite délicatement ajoutée au fond du tube, sous la couche de KBr de densité 1,006. Les tubes sont ensuite ultracentrifugés à 65 000 rpm pendant 45 minutes dans un rotor vertical fixe. Par la suite, le contenu du tube est prélevé séquentiellement du fond vers le sommet du tube, permettant ainsi d'obtenir les différentes fractions correspondant aux différentes sous-classes de lipoprotéines. La concentration en cholestérol de chaque sous-classes de lipoprotéines est évaluée en utilisant un test enzymatique (Figure 13) (Chung et al. 1980; Kulkarni 2006).

Une autre méthode de séparation des sous-fractions de HDL en fonction de leurs tailles et de leurs charges est la technique d'électrophorèse en gel polyacrylamide (PAGE) selon un gradient non-dénaturant. Cette technique permet de séparer les HDL en cinq sous-populations de tailles décroissantes : deux sous-populations de HDL<sub>2</sub> [(HDL<sub>2b</sub> (9.7–12.9 nm, d=1,115), HDL<sub>2a</sub> (8.8–9.7 nm, d=1,136)] et trois sous-populations de HDL<sub>3</sub> [HDL<sub>3a</sub> (8.2–8.8 nm, d=1,136), HDL<sub>3b</sub> (7.8–8.2 nm, d=1,154) et HDL<sub>3c</sub> (7.2–7.8 nm, d=1,171)]. Ce même isolement a pu être reproduit par ultracentrifugation isopycnique à gradient de densité. L'ultracentrifugation isopycnique consiste à déposer du plasma alourdi avec du KBr à une densité de 1,21. Puis, au-dessus de ce plasma alourdi est déposé un gradient décroissant de densité de solution de KBr allant de 1,063 à 1,019 et 1,006 au sommet du tube. Les lipoprotéines sont ensuite isolées du plasma en une unique ultracentrifugation dans un rotor avec des godets pivotants (Chapman et al. 1981; Nichols et al. 1986).

Les gels d'électrophorèses en deux dimensions (2D) permettent une plus grande séparation des différentes sous-populations de HDL. Une première migration sur gel

d'agarose sépare les particules de HDL alpha et pré-alpha en fonction de leur charge. Les sous-populations de HDL dans le gel d'agarose sont ensuite séparées sur un gel de polyacrylamide en gradient non-dénaturant, en fonction de leur taille. Les protéines du gel sont transférées sur une membrane qui est hybridée/incubée avec un anticorps anti-Apo A-I. Cette technique a permis d'identifier 12 sous-populations de HDL (**Figure 12**) (**Asztalos et al. 1993; Asztalos and Schaefer 2003**).

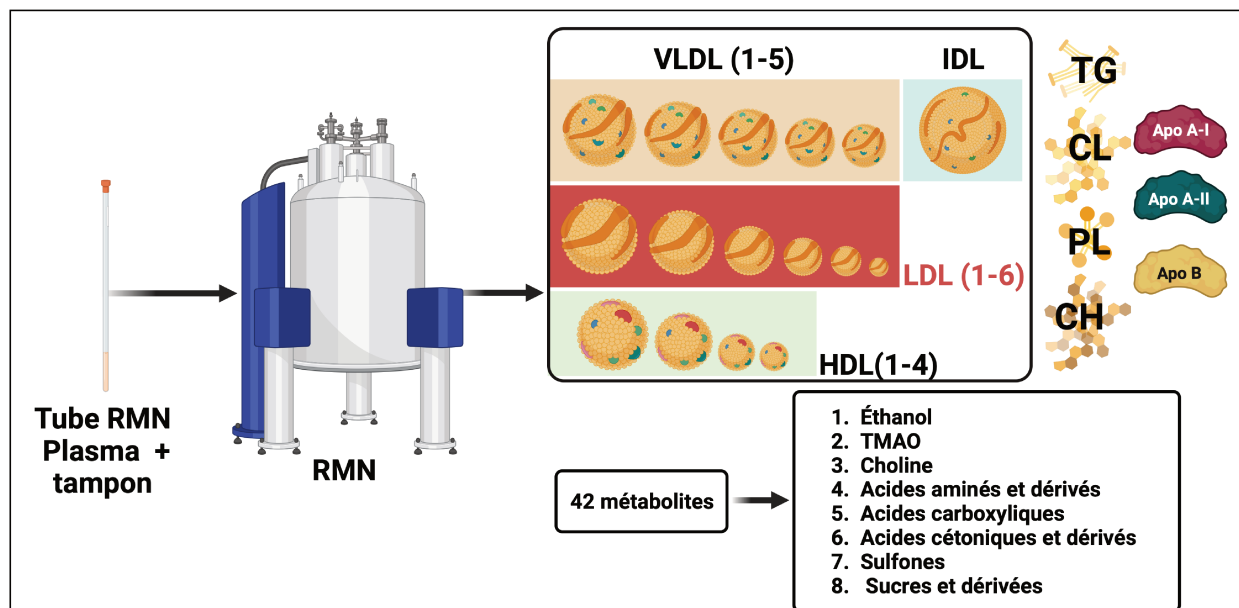
Actuellement, certaines études cliniques utilisent une nouvelle technique de séparation des HDL reposant sur le modèle de gel d'électrophorèse non-dénaturant, le **Lipoprint HDL** (**Tanaka et al. 2019; Lappegård et al. 2021**).





La RMN, comme le Lipoprint, permet l'étude des différentes sous-populations de HDL sans nécessiter l'isolement de ces dernières du plasma. Cette technique exploite les propriétés du groupe méthyle terminal des lipides qui les composent, pour identifier les différentes tailles de lipoprotéines. Lorsque les lipoprotéines de grosse taille sont soumises à une impulsion électromagnétique par la RMN, les lipides qui les composent émettent des signaux dont la forme est différente avec des fréquences supérieures à celles émises par les particules de plus petites tailles. Ces signaux sont observables sur un spectre du proton **(Lounila et al. 1994; Jeyarajah et al. 2006)**. Cette distinction entre les signaux émis pour les différentes tailles de lipoprotéines permet d'identifier et de quantifier les différentes sous-populations de lipoprotéines, allant des VLDL aux différentes sous-fractions de HDL (petite, intermédiaire, large). De nombreux logiciels ont été développés sur cette base afin de permettre la détermination quantitative automatique des différentes sous-populations de lipoprotéines **(Jeyarajah et al. 2006)**.

Les études qui s'intéressent aux différentes tailles lipoprotéines à partir de la RMN utilisent désormais principalement des logiciels de dosage automatique de ces lipoprotéines qui sont *NMR LipoProfile*®, *The Lipoprotein Fractionation NMR* ou encore le module Bruker IVDr B.I. LISA **(Lappegård et al. 2021)**.



**Figure 15. Méthode de dosage des sous-classes de lipoprotéines et des métabolites par RMN couplée au module Bruker IVDr B.I. LISA.**

La RMN couplée au module **Bruker IVDr B.I. LISA** (Figure 15) permet de mesurer directement à partir du plasma la concentration en cholestérol, triglycérides, cholestérol libre et phospholipides de cinq sous-populations de VLDL, des IDL, de six sous-populations de LDL et de quatre sous-populations de HDL. Cette méthode mesure également la concentration en Apo B et le nombre de particules dans les VLDL, IDL et les sous-populations de LDL. De plus, elle quantifie la concentration en Apo A-I et Apo A-II dans les différentes sous-populations de HDL. Outre la quantification des sous-classes de lipoprotéines, elle permet également la quantification simultanée de 42 métabolites. Toutes ces mesures sont effectuées à partir d'un spectre de l'hydrogène à une dimension. Cette technique présente l'avantage de nécessiter une préparation minimale de l'échantillon, de permettre sa récupération, et de présenter une bonne répétabilité.

L'importante hétérogénéité des particules de HDL est principalement due à la structure hautement dynamique de l'Apo A-I, qui permet des conformations différentes en fonction de la quantité de lipide et de la taille de la nanoparticule (Catte et al. 2006; Davidson and Thompson 2007). Précédemment, les HDL étaient définies comme une famille de nanoparticule qui comprenait de l'Apo A-I et une composition diverse d'autres protéines (Alaupovic et al. 1972; Alaupovic 1996). Cependant, plusieurs familles de HDL ont été identifiées dans le plasma, isolée par des techniques immunologiques comme la chromatographie d'immunoaffinité ou l'immunoprécipitation séquentielle. Les deux principales sont les HDL contenant uniquement de l'Apo A-I nommée LpA-I, et les HDL portant de l'Apo A-I et de l'Apo A-II, appelées LpA-I :A-II ont été révélées par western Blot (Bekaert et al. 1991; Alaupovic 1996, 2003). Les particules de LpA-I se subdivisent en plusieurs sous-populations en fonction du nombre d'Apo A-I qu'elles portent. Le nombre d'Apo A-I varie de deux à trois ou quatre, et est positivement corrélé avec la taille de la particule. Tandis que les particules LpA-I :A-II ont une taille uniforme, contiennent deux



molécules d'Apo A-I et un nombre variable d'Apo A-II, allant d'une à trois molécules (Gauthamadasa et al. 2010).

Les différentes sous-classes de HDL en fonction de la technique d'isolement sont résumées dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3. Principales sous-classes de HDL en fonction des différentes techniques d'isolement (traduit de (Kontush et al. 2015)).**

<b>Densité (ultracentrifugation)</b>
HDL2 (1,063-1,125 g/mL)
HDL3 (1,125-1,21 g/mL)
<b>Taille (électrophorèse sur gel polyacrylamide gradient non-dénaturant)</b>
HDL2b (9,7-12,0 nm)
HDL2a (8,8-9,7 nm)
HDL3a (8,2-8,8 nm)
HDL3b (7,8-8,2 nm)
HDL3c (7,2-7,8 nm)
<b>Taille (RMN)</b>
HDL large (8,8-13,0 nm)
HDL médium (8,2-8,8 nm)
HDL petit (7,3-8,2 nm)
<b>Forme et charge (gel d'agarose)</b>
$\alpha$ -HDL (HDL sphérique)
Pré $\beta$ -HDL (HDL discoïdaux)
<b>Charge et taille (électrophorèse 2D)</b>
Pré $\beta$ -HDL (pré $\beta$ 1 et pré $\beta$ 2)
$\alpha$ -HDL ( $\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 3 et $\alpha$ 4)
Pré $\alpha$ -HDL (pré $\alpha$ 1, pré $\alpha$ 2 et pré $\alpha$ 3)
<b>Composition de protéine (électroimmunodiffusion)</b>
LpA-I
LpA-II

## 2. Le protéome des HDL : une diversité fonctionnelle

Les HDL présentent une importante diversité protéique par rapport aux autres classes de lipoprotéines. L'étude de la composition en protéines des HDL de manière semi-quantitative a été permise grâce à l'électrophorèse 2D couplée à la de spectrométrie de masse (Karlsson et al. 2005a).

Cependant, l'identification et la quantification des différentes protéines des HDL dépendent de plusieurs facteurs : la méthode d'isolement de ces lipoprotéines, la conservation de l'échantillon biologique de départ ainsi que la technologie de spectrométrie de masse utilisée. Les HDL isolées par la technique de **chromatographie en phase liquide** (FPLC : *Fast Protein Liquid Chromatography*) par gel filtration, présente une forte contamination par de l'albumine et d'autres protéines plasmatiques qui co-éluent avec les HDL (Wiesner et al. 2009; Collins et al. 2010). Les méthodes d'isolement par **immunoaffinité** à l'aide d'anticorps anti-Apo A-I présentent aussi des limites. Parmi ces limites, la capacité de l'anticorps à se lier uniquement à une unique conformation d'Apo A-I, et aussi son interaction possible avec des contaminants. De plus, pour les décrocher de l'anticorps, les HDL doivent être soumises à des pH extrêmes qui sont susceptibles de modifier leur composition (Cheung and Albers 1984; Davidson et al. 2022). Tout comme avec la chromatographie par filtration sur gel, la séparation par **électrophorèse multidimensionnelle** du plasma peut entraîner la co-migration de contaminants avec les protéines des HDL. Les HDL sont exposées à un certain nombre de stress importants au cours de l'ultracentrifugation sur gradient de densité de sel. Parmi ces stress, les forces de cisaillement dus à la centrifugation, les forces ioniques importantes en raison des sels utilisés qui peuvent possiblement affecter la composition des HDL. Ceci étant, l'ultracentrifugation à densité de sel, reste la technique d'isolement de référence pour l'analyse du protéome des HDL. De plus, l'ultracentrifugation est la seule technique pour laquelle les lipoprotéines isolées à une densité de 1,063 et 1,21 sont nommées les HDL (Delalla et al. 1954; Havel et al. 1955; Munroe et al. 2015).

La première étude de lipoprotéomique a permis d'identifier 13 protéines après isolement par ultracentrifugation, puis migration sur un gel électrophorèse 2D et analyse des différents spots obtenue sur gel par spectrométrie de masse (Figure 16) (Karlsson et al. 2005a).

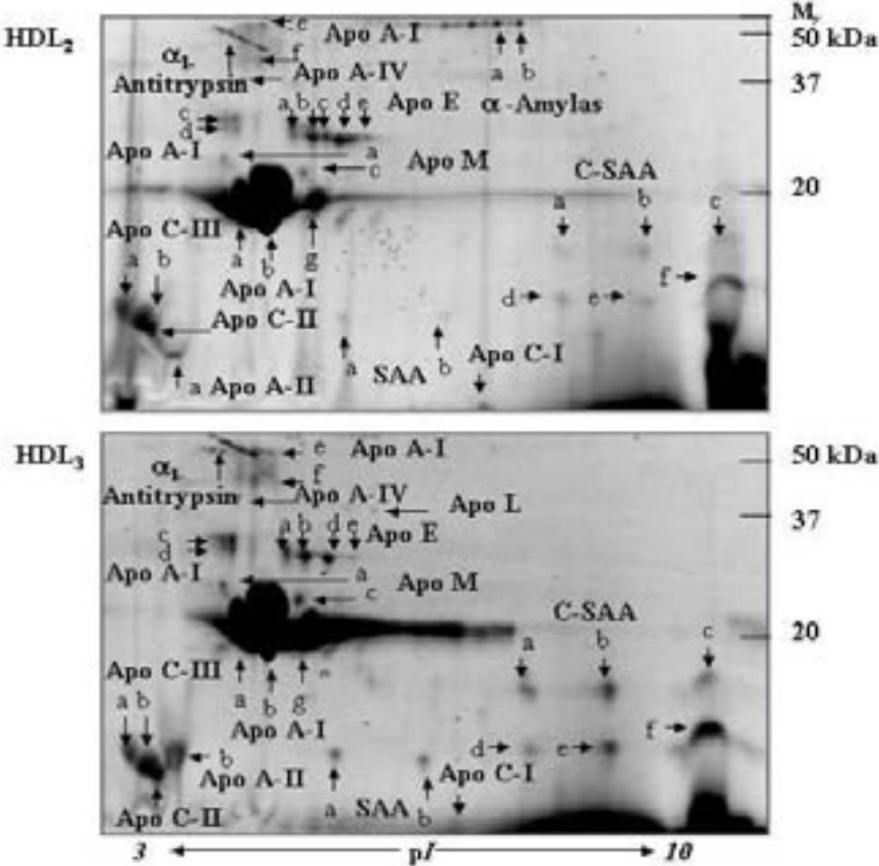


Figure 16. Composition en protéines des HDL par spectrométrie de masse sur 2D-PAGE (Karlsson et al. 2005a).



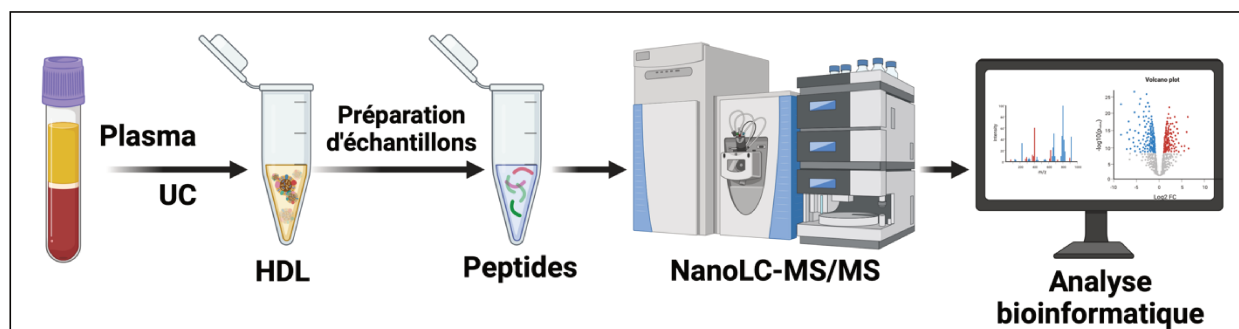


Figure 18. Caractérisation du protéome des HDL par protéomique *shotgun*.

La **protéomique *shotgun*** utilisant la spectrométrie de masse est la méthode la plus largement utilisée pour la quantification non-biaisée des protéines à partir d'échantillons biologiques. La réalisation de cette technique requiert une **préparation préalable de l'échantillon**.

Dans notre cas, les HDL sont isolées à partir du plasma par ultracentrifugation. Ensuite, une quantité connue en protéines est solubilisée puis dénaturée dans un tampon acidifié comprenant un agent dénaturant comme l'urée. Après la dénaturation, les ponts disulfures des protéines sont réduits par le dithiothréitol. Les protéines sont ensuite alkylées par l'iodoacétamide. Après les étapes de **réduction** et **d'alkylation**, l'agent dénaturant est dilué puis les protéines sont **digérées** par la trypsine. La trypsine hydrolyse les chaînes polypeptidiques du côté carboxy-terminale des résidus arginine et de lysine excepté si elles sont suivies d'une proline, produisant des peptides dont la longueur et la charge permettent leur détection par spectrométrie de masse. Après digestion, l'activité de la trypsine est stoppée par acidification, les peptides sont ensuite purifiés sur phase solide afin de venir éliminer toutes substances interférentes (protéines non-digérées, agent dénaturant). Les peptides purifiés sont ensuite séchés, puis, solubilisés dans le tampon d'injection du spectromètre de masse. Les peptides sont séparés dans un nanocapillaire (colonne) par chromatographie liquide (LC) couplée à une source d'ion Nanospray (NSI). Les ions formés par le NSI sont accélérés et entrent dans le spectromètre de masse hybride capable d'isoler les ions intacts et de les fragmenter avant de mesurer la masse des fragments, ce processus se nomme la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Plusieurs spectres MS/MS sont ainsi collectés au cours de l'expérience, pour l'analyse qualitative des peptides d'un échantillon. Après l'analyse en spectrométrie de masse, la première étape d'analyse des données est d'identifier les peptides et les protéines associées. Pour cela, les fichiers bruts sont confrontés à une base de données pour apparier les peptides en fonction de leur spectre MS/MS, générant un score de correspondance peptide-spectre (PSM). Le PSM est ensuite validé statistiquement par un taux de fausse découverte ( $FDR > 1\%$ ). Après la détermination de la séquence des peptides, les protéines sont identifiées par la présence d'au moins deux peptides uniques qui les composent. Pour la quantification relative des protéines dans l'échantillon, elle correspond à la somme des intensités des peptides uniques identifiés pour chaque protéine. Enfin, les analyses sont suivies **d'analyses statistiques** pour évaluer les différences entre deux conditions (Figure 18).

Les protéines retrouvées dans les HDL peuvent être divisées en plusieurs groupes comme les apolipoprotéines, les protéines de transfert de lipides, les composés du complément, les inhibiteurs de protéases, les protéines de la phase aiguë et d'autres protéines minoritaires (Tableau 4). L'ensemble de ces protéines participe aux propriétés pléiotropes des HDL (Kontush et al. 2015; Davidson et al. 2022).

**Tableau 4. Composants majoritaires du protéome des HDL (traduit et adapté de (Kontush et al. 2015)).**

Protéine	Masse (kDa)	Fonction principale
<b>Apolipoprotéines</b>		
Apo A-I	28	Principale apolipoprotéine structurelle et fonctionnelle, activateur de la LCAT
Apo A-II	17	Structure des HDL, inhibitrice LPL
Apo A-IV	46	Modulation de l'assemblage et le métabolisme des lipoprotéines riches en TG
Apo C-I	6,6	Activatrice de LCAT, inhibitrice de LPL, modulateur de CETP
Apo C-II	8,8	Activatrice LPL
Apo C-III	8,8	Inhibitrice de LPL et de l'élimination des lipoprotéines riches en TG
Apo C-IV	11	Régule le métabolisme des TG
Apo D	19	Liaison de petites molécules hydrophobes
Apo E	34	Apolipoprotéine structurelle et fonctionnelle, ligand du LDL-R et du LRP
Apo F	29	Inhibitrice du CETP
Apo H/ bêta-2-glycoprotéine	38	Liaison de molécules chargées négativement
Apo J/Clusterin	70	Liaison des molécules hydrophobes, interaction avec les récepteurs cellulaires
Apo L1	44/46	Facteur trypanolytique du sérum humain
Apo M	25	Liaison de petites molécules hydrophobes
<b>Enzymes</b>		
LCAT	63	Estérification du cholestérol
PON1	43	Lactonase dépendante du calcium, enzyme antioxydante
PAF-AH (LpPLA <sub>2</sub> )	53	Hydrolyse des phospholipides oxydés à chaîne courte
GSPx-3	22	Réduction des hydroperoxydes par le glutathion
<b>Protéines de transfert des lipides</b>		
PLTP	78	Conversion des HDL en particules plus grandes et plus petites, transport du LPS
CETP	74	Hétéro-échange de CE et de TG et homo-échange de PL entre les HDL et les lipoprotéines contenant de l'Apo B
<b>Protéine de la phase aiguë</b>		
SAA-1	12	Principale protéine en phase aiguë
SAA-4	15	Protéine mineure en phase aiguë
Alpha-2-HS-glycoprotéine	39	Protéine négative en phase aiguë
Fibrinogène chaîne alpha	95	Précurseur de la fibrine, cofacteur de l'agrégation plaquettaire
<b>Composé du complément</b>		
Complément C3	187	Activation du complément
<b>Protéinase inhibiteurs</b>		
Alpha-1-antitrypsine	52	Inhibiteur des protéases à sérine et notamment l'élastase
Haptoglobin-related protein	39	Substrat leurre pour empêcher la protéolyse
<b>Autre protéines</b>		
Transthyréine	55	Liaison et transport de l'hormone thyroïdienne
Sérotransferrine	75	Liaison et transport du fer
Protéine de liaison à la vitamine D	58	Liaison et transport de la vitamine D
Alpha-1β-glycoprotéine	54	Inconnue
Hemopexin	52	Liaison et transport de l'hème

Apo : apolipoprotéine, CE : ester de cholestérol, CETP : *Cholesteryl Ester Transfer protein*, GSPx-3 : *Glutathione Selenoperoxidase 3*, LDL-R : récepteur aux LDL, LCAT : *lecithin/cholesterol acyltransferase*, LPL : lipoprotéine lipase, LpPLA<sub>2</sub> : *lipoprotein-associated phospholipase A2*, LRP : *LDL receptor-related protein*, PAF-AH : *platelet-activating factor acetyl hydrolase*, PL : phospholipide, PLTP : Phospholipid Transfer Protein, PON1 : paraoxonase 1, SAA : Sérum amyloïde A, TG : triglycérides.



### a) Les apolipoprotéines

Au-delà des apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme des lipides comme les Apo A-I, A-II, C et E, les HDL transportent aussi d'autres apolipoprotéines.

#### (1) L'apolipoprotéine D

L'apolipoprotéine D est détectée à la surface des HDL (McConathy and Alaupovic 1973). L'Apo D est très peu exprimée dans le foie et l'intestin contrairement aux autres apolipoprotéines. Les glandes surrénales et les reins sont les organes où est retrouvée l'expression en ARNm de l'Apo D la plus élevée (Drayna et al. 1986). L'Apo D est une protéine sécrétée et malgré un faible taux d'expression en ARNm hépatique, sa concentration protéique dans le foie est élevée (Uhlén et al. 2015). L'Apo D transporte des lipides notamment l'acide arachidonique, les stéroïdes, le cholestérol et aussi d'autres ligands. Cette capacité à se lier à de multiples ligands reflète le caractère multifonctionnel de l'apoprotéine (Rassart et al. 2000).

#### (2) L'apolipoprotéine H

L'apolipoprotéine H, aussi connue sous le nom de béta-2 glycoprotéine 1 est associée aux lipoprotéines et elle est synthétisée par le foie mais sa fonction physiologique reste encore mal connue (Polz and Kostner 1979; Polz et al. 1979). Cette apolipoprotéine présenterait plusieurs fonctions notamment dans le métabolisme lipidique en activant la LPL (Nakaya et al. 1980). Aussi, cette apolipoprotéine semble impliquée dans la régulation du complément et de la coagulation (Miyakis et al. 2004; Gropp et al. 2011). L'Apo H est le principal antigène du syndrome auto-immun des anti-phospholipides (Schwarzenbacher et al. 1999).

#### (3) L'apolipoprotéine J

L'apolipoprotéine J ou *clusterine* est associée aux HDL et aux LDL dans la circulation. L'expression de l'ARNm de la *clusterine* est ubiquitaire (De Silva et al. 1990) et sa fonction physiologique est mal connue. Néanmoins, cette apolipoprotéine est multifonctionnelle. Elle représente une protéine chaperonne dans la circulation, qui permet la clairance des protéines mal repliées (Wyatt et al. 2011) et elle possède aussi des fonctions anti-apoptotiques et une capacité d'interaction avec de nombreux ligands comme des lipides, des protéines amyloïdes ou avec elle-même (Wyatt et al. 2011; Pereira et al. 2018).

#### (4) L'apolipoprotéine L

L'apolipoprotéine L figure comme un composé minoritaire des HDL (Duchateau et al. 1997). Si sa fonction dans le métabolisme lipidique est encore inconnue, la concentration en apolipoprotéine L est corrélée positivement avec les triglycérides (Duchateau et al. 2000).

Les apolipoprotéines L représentent une famille de six apolipoprotéines (Apo L-I à Apo L-VI) (Page et al. 2001). L'Apo L-I est exprimée dans le pancréas, le poumon, la prostate, le foie, le placenta et la rate. Elle est un composant de l'activité trypanolytique humaine, qui permet de lutter contre le *Trypanosoma brucei*, un parasite responsable de la maladie du sommeil. Les HDL, qui contiennent l'haptoglobine et l'Apo L1 sont internalisées par le trypanosome. L'Apo L1 forme des pores dans la membrane du parasite, déclenchant des flux ioniques osmotiques fatals pour le parasite (Vanhollebeke et al. 2007). Cette apolipoprotéine partage des similitudes avec la protéine intracellulaire de la famille Bcl-2 régulant l'apoptose (Duchateau et al. 1997; Wan et al. 2008).

#### (5) L'apolipoprotéine M

L'apolipoprotéine M se retrouve associée aux HDL dès sa synthèse à la suite de laquelle elle sera échangée avec les TRL et les LDL dans la circulation sanguine. L'Apo M est une lipocaline principalement exprimée dans le foie et les reins et de façon minoritaire dans les tissus adipeux (Xu and Dahlbäck 1999). Cette apolipoprotéine possède une poche hydrophobe, lui permettant d'interagir avec des petites molécules hydrophobes, principalement la sphingosine-1-phosphate (S1P) (Ahnström et al. 2007). La S1P est un sphingolipide bioactif qui interagit avec cinq récepteurs à la S1P (S1PR1-5) qui régulent de nombreuses fonctions biologiques (l'angiogenèse, améliore la barrière endothéliale, régulation de la migration des lymphocytes). La combinaison Apo M, S1P et HDL présente de nombreuses fonctions vasculo-protectrices (Christoffersen et al. 2011; Zheng et al. 2019). Aussi, l'Apo M participe au métabolisme lipidique en contribuant à l'enrichissement en lipides des préβ-HDL (Wolfrum et al. 2005; Mulya et al. 2010). L'Apo M est préférentiellement associée au HDL3 (Davidson et al. 2009) et sa concentration est potentiellement régulée dans la réponse immunitaire, par les cytokines ou encore les facteurs inflammatoires. Toutefois l'origine de ces mécanismes reste encore inconnue (Xu et al. 2002). Par exemple, la concentration en Apo M est retrouvée diminuée chez les patients souffrant de diabète. De plus, la concentration en Apo M est diminuée durant un diabète de type MODY comparé à des sujets contrôles et le diabète de type 1, mais ce n'est pas le cas pour le diabète de type 2 (DT2). L'Apo M pourrait ainsi constituer un marqueur permettant de distinguer un diabète de type MODY d'un diabète de type 1 (Christoffersen et al. 2011; Mughal et al. 2013).

#### b) Les enzymes

Les HDL transportent aussi des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et dans les réactions d'oxydoréduction.



### (1) Lécithine Cholestérol Acyltransférase (LCAT)

La LCAT identifiée par Glomset, catalyse l'estérification du cholestérol dans les lipoprotéines (Glomset et al. 1966). La LCAT est une glycoprotéine produite majoritairement par le foie (Warden et al. 1989) et elle circule dans le plasma associée principalement aux HDL. Son activité est essentielle au remodelage des lipoprotéines, en particulier lors de la maturation des HDL (Glomset et al. 1966; Chen and Albers 1982). La LCAT est activée principalement par l'Apo A-I, mais son activation dépend aussi de l'Apo A-II, l'Apo A-IV, l'Apo C-I, l'Apo C-III et de l'Apo E (Jonas 1991). Lorsque la LCAT est activée, elle interagit avec la phosphatidylcholine et le cholestérol libre pour former respectivement des lysophosphatidylcholines et des esters de cholestérol (Fielding et al. 1972). La LCAT est responsable de l'estérification du cholestérol libre associé aux lipoprotéines contenant de l'Apo A-I (activité  $\alpha$ ) et de l'Apo B (activité  $\beta$ ) (Barter 1983). L'activité de la LCAT est réduite lors de la formation des grosses particules sphériques de HDL, possiblement dû à l'enrichissement des HDL en sphingomyéline (Bolin and Jonas 1996; Kosek et al. 1999). La LCAT présente aussi de nombreuses autres fonctions comme l'hydrolyse des lécithines (phosphatidylcholine) oxydées contribuant ainsi à la détoxification des lipoprotéines oxydées. Elle contribue ainsi aux propriétés antioxydantes et participe également aux propriétés anti-inflammatoires des HDL (Goyal et al. 1997; Subramanian et al. 1999; Itabe et al. 1999). Le déficit en LCAT se retrouve dans deux maladies héréditaires rares : le déficit familial en LCAT (FLD) et la maladie des yeux de poisson (FED), qui se caractérisent respectivement par une déficience totale et une déficience partielle de la LCAT. Les patients atteints de FED sont incapables d'estérifier le cholestérol des HDL, mais pourront estérifier le cholestérol des lipoprotéines à Apo B (Norum and Gjone 1967; Carlson and Philipson 1979). Cette déficience totale ou partielle induit des concentrations basses en HDL-C et des concentrations élevées de triglycérides. Cependant, les mutations FLD et FED sont associées pour la première à une diminution et pour la seconde à une augmentation de l'athérosclérose. Cette divergence s'expliquerait par la capacité de la LCAT à générer des esters de cholestérol dans les lipoprotéines contenant de l'Apo B dans la maladie de FED (Oldoni et al. 2018).

### (2) Phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (PAF-AH/LpPLA<sub>2</sub>)

La phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (LpPLA<sub>2</sub>) fait partie du groupe VII de la superfamille des phospholipases A2 (PLA<sub>2</sub>) qui comprend six types divisés en 16 groupes. Les PLA<sub>2</sub> hydrolysent tout particulièrement la liaison du groupement acyle sn-2 des phospholipides conduisant à la formation d'un acide gras libre et d'un lysophospholipide. La LpPLA<sub>2</sub> est aussi appelée *Platelet-Activating Factor Acetyl Hydrolase* (PAF-AH) en raison de

son activité hydrolytique sur le facteur d'activation des plaquettes (PAF) (Schaloske and Dennis 2006). Cette enzyme est produite par le tissu adipeux blanc, le cerveau et abondamment par les macrophages (Elstad et al. 1989; McIntyre et al. 2009). La LpPLA2 peut hydrolyser les phosphatidylcholines (PC) à courte chaîne conduisant à la formation de LPC et d'un acide gras libre. L'efficacité de l'hydrolyse diminue lorsque la chaîne carbonée est allongée et elle est inactive contre les chaînes longues non -oxydées. Également, la LpPLA2 hydrolyse les phospholipides oxydés pro-inflammatoires à chaînes courtes (Stremler et al. 1991; Dennis et al. 2011). Elle serait potentiellement pro-inflammatoire. En effet, l'hydrolyse des LDL oxydées par la LpPLA2 produit des lysophosphatidylcholines et des acides gras non-estérifiés oxydés, qui sont des produits pro-inflammatoires et pro-athérogènes (Zalewski and Macphee 2005; Huang et al. 2020b).

### (3) Paraoxonase

Les paraoxonases (PON) appartiennent à la famille des lactonases. Elles possèdent la capacité d'hydrolyser les lactones, esters, dont le groupe fonctionnel —CO—O— fait partie d'un cycle. Les PON se composent de trois membres : PON1, PON2 et PON3 (Primo-Parmo et al. 1996; Draganov and La Du 2004). **PON1** est la première paraoxonase à avoir été identifiée, et son nom lui vient de sa capacité à hydrolyser le substrat organophosphoré, le paraoxon (Mazur 1946). La paraoxonase-1 présente des propriétés neuroprotectrices du fait de sa capacité à hydrolyser de nombreux substrats organophosphorés et des esters d'acide carboxyliques aromatiques (Harel et al. 2004; Draganov et al. 2005). PON-1 est majoritairement synthétisée par le foie et sécrétée dans la circulation associée principalement aux HDL (Deakin et al. 2002). Grâce aux HDL, elle est retrouvée dans de nombreux tissus (Mackness et al. 2010). PON1 est l'une des enzymes responsables des propriétés antioxydantes des HDL, en raison de sa contribution à la réduction de l'accumulation des produits de peroxydation lipidique dans les LDL, et l'inhibition de l'oxydation des HDL et des LDL (Mackness et al. 1991, 1993, 1997; Aviram et al. 1998). PON1 exerce aussi une activité anti-inflammatoire qui contribue à celle des HDL, en réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et interleukine-6) ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène, PON1 réduit la réponse inflammatoire des macrophages (Aharoni et al. 2013). **PON-2** n'est pas retrouvée sur les lipoprotéines, mais elle est exprimée par de nombreux tissus incluant le cerveau, le foie, le rein. Cependant, elle présente également une activité antioxydante et anti-inflammatoire (Mochizuki et al. 1998; Ng et al. 2006). La **paraoxonase-3** (PON-3) est associée aux HDL et présente une activité anti-inflammatoire et antioxydante similaire à celle de PON1 (Reddy et al. 2001).

### *c) Les protéines de transfert de lipides*

Les HDL transportent également des protéines de transfert de lipides. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des lipoprotéines.

#### **(1) Phospholipid Transfer Protein (PLTP)**

La *Phospholipid Transfer Protein* (PLTP) appartient à la famille des protéines de transfert des lipides comme la CETP ou encore la protéine de liaison aux lipopolysaccharides (LPS) (Day et al. 1994). La PLTP est synthétisée principalement par le placenta et le foie et aussi par le cerveau et le pancréas (Vuletic et al. 2003). Deux formes de PLTP existent dans la circulation, une forme « active » qui peut transférer la PC des nanoparticules aux HDL et une forme « inactive » qui ne présente pas cette fonction (Oka et al. 2000; Kärkkäinen et al. 2002). La PLTP convertit les HDL sphériques en grosse et petites HDL (Lusa et al. 1996; Settasatian et al. 2001) et joue un rôle dans le transport des phospholipides extracellulaires. En se liant aux LPS, la PLTP est capable de les transférer sur les HDL (Hailman et al. 1996; O'Brien et al. 2003).

#### **(2) Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP)**

La CETP est une glycoprotéine synthétisée principalement par le foie et le tissu adipeux qui appartient aussi à la famille des protéines de transfert des lipides (Hesler et al. 1987). Dans la circulation, on la retrouve associée aux HDL et aux lipoprotéines à Apo B. La CETP a pour fonction le transfert bidirectionnel des esters de cholestérol et des triglycérides entre les lipoprotéines à Apo B et les HDL (Barter et al. 1982). Le transfert des esters de cholestérol et des triglycérides peut se faire par deux mécanismes. Le premier utilise la CETP comme navette à laquelle, les lipoprotéines se lient pour échanger leur triglycéride ou les esters de cholestérols avec la CETP, en fonction de la lipoprotéine associée. Ensuite, la CETP se détache de la lipoprotéine et circule librement dans le plasma jusqu'à ce qu'elle trouve une nouvelle lipoprotéine à qui se lier. La CETP recommence ainsi le complexe transitoire (Pattnaik and Zilversmit 1979; Barter et al. 1982). Le second mécanisme de transfert par la CETP est un mécanisme de tunnel. La particule de HDL se lie au domaine N-terminal de la CETP tandis que la LDL ou la VLDL se lie à son domaine C-terminal. Il s'ensuit l'ouverture d'un tunnel à travers duquel les VLDL ou LDL s'appauvrissent en triglycérides et s'enrichissent en esters de cholestérols alors que pour la HDL c'est l'inverse qui se produit (Zhang et al. 2012). Les HDL ainsi enrichies en triglycérides sont de plus petite taille et deviennent pro-athérogènes. C'est pour cette raison que l'inhibition de la CETP est devenue une cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires (Tall and Rader 2018; Girona et al. 2019).

La distribution de ces différents composants protéiques diverge entre les différentes sous-populations de HDL. Les HDL3 petites et denses sont enrichies exclusivement et préférentiellement en enzyme (PON-1, PON-3) et certaines protéines comme en Apo M et J, comparées aux HDL2 larges qui eux possèdent préférentiellement et exclusivement les apolipoprotéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines à Apo B comme les Apo B, E, C-II, C-III. Cet enrichissement protéique des HDL3 petites et denses contribue à accroître leurs fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires (Davidson et al. 2009) (Figure 19).

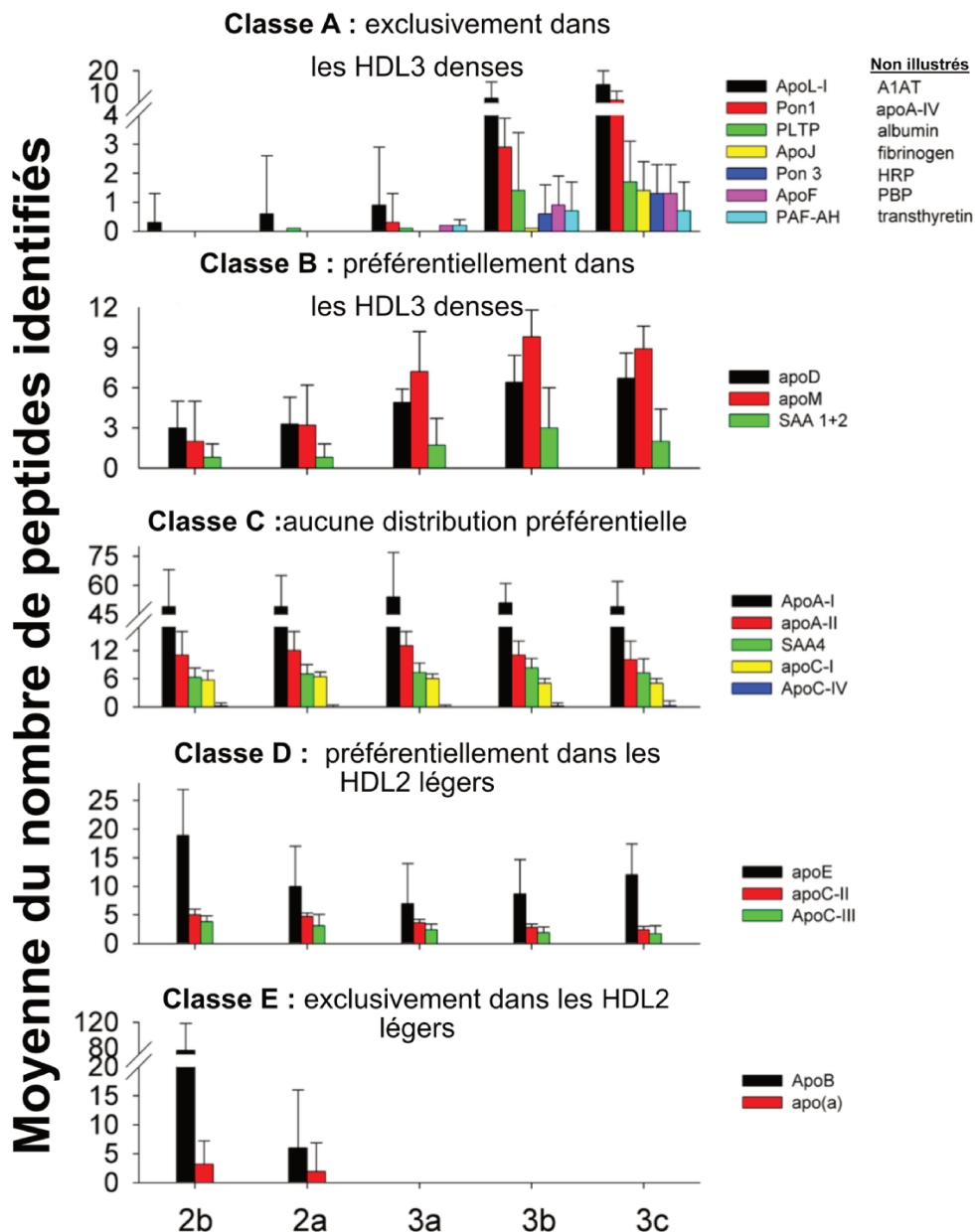


Figure 19. Profils d'abondance des protéines représentatives des sous-populations de HDL (adaptée de (Davidson et al. 2009)).

### 3. Le lipidome des HDL

Au-delà de leur composition en protéines très diverses, les espèces lipidiques qui composent les HDL n'en sont pas moins plus importantes. Ces composants lipidiques étaient aux départs caractérisés majoritairement selon leur classe principale, c'est-à-dire, phospholipides, cholestérol, esters de cholestérol et triglycérides. Outre les niveaux de HDL-C, les phospholipides sont la classe de lipides la plus abondante du lipidome des HDL. Les phospholipides comprennent les sphingomyélines, qui représentent 40 à 60% du poids total en lipides, viennent ensuite les esters de cholestérol (30-40%), les triglycérides (5-12%) et enfin le cholestérol libre (5 à 10%) (Wiesner et al. 2009). Actuellement, le lipidome des HDL compte plus de 200 sous-espèces moléculaires individuelles de lipides identifiées (Wiesner et al. 2009; Yetukuri et al. 2010). Grâce à la spectrométrie de masse, différentes classes de lipides ont été identifiées, regroupées en cinq grandes familles, résumées dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5. Principaux lipides du lipidome des HDL (traduit et adaptée de (Kontush et al. 2013, 2015)).**

Classe de lipide	% en poids total de lipides des HDL	Principales sous-espèces
<b>Phospholipides</b>	37,4-49,3	Phosphatidylcholine
Phosphatidylcholine (PC)	32-35	16:0/18:2, 18:0/18:2, 16:0/20:4, 16:0/18:1
Lysophosphatidylcholine (LPC)	1,4-8,1	16:0, 18:0, 18:1, 18:2
PC-Plasmalogènes	2,2-3,5	
Phosphatidyléthanolamine (PE)	0,70-0,87	16:0/18:2, 18:0/18:2, 18:0/20:4
PE-Plasmalogènes	0,54-0,87	
Phosphatidylinositol (PI)	0,47-0,76	18:0/20:3, 18:0/20:4
Phosphatidylsérine (PS)	0,02-0,03	16:0/18:0
Phosphatidylglycérol (PG)	0,004-0,006	18:1/20:2
Acide phosphatidique (PA)	0,006-0,009	20:0/20:4, 20:2/20:4, 18:2/20:1
Cardiolipine	0,077-0,201	
<b>Sphingolipides</b>	5,7-6,9	Sphingomyéline
Sphingomyélines (SM)	5,6-6,6	18 :1/16 :0, 18 :2/24 :0, 18 :1/24 :1, 18 :2/22 :0, 18 :1/22 :1
Céramides (Cer)	0,022-0,097	24:0, 24:1, 23:0, 22:0, 16:0
Sphingosine-1-phosphate (S1P)	0,015-0,046	
d18 :1		
S1P d18:0	0,007	
Sphingosylphosphorylcholine d18 :1	0,001	
<b>Lipides neutres</b>	46,7-54,0	
Esters de cholestérol (CE)	35-37	
Cholestérol libre (FC)	8,7-13,5	
Triacylglycérol (TG)	2,8-3,2	
Diacylglycérol (DAG)	0,17-0,28	
<b>Lipides mineurs</b>		
Acides gras libres (FA)	ND	16:0, 18:0, 18:1
PC contenant de l'isoprostane	ND	Isoprotaglandine E2/D2-PC (36:4)

Les **phospholipides** transportés majoritairement par les HDL sont les phosphatidylcholines (PC), les lysophosphatidylcholines (LPC), les **phosphatidyléthanolamines** (PE), les PE- et PC- plasmalogènes et les **céramides** (Cer). Les autres phospholipides comme les **phosphatidylglycérols** (PG), les **phosphatidylsérines** (PS), les acides phosphatidiques (PA) et les **cardiolipines** sont minoritaires. La classe de phospholipides la plus abondante est celle des **phosphatidylcholines** qui représente de 32 à 35 % du poids en lipides des HDL (**Wiesner et al. 2009; Kontush et al. 2015**). Les PC contribuent à la structure des membranes cellulaires et aussi à celle des lipoprotéines. Les PC peuvent avoir une origine hépatique (formation de pré $\beta$ -HDL) et extra-hépatique (sous l'action de la CETP et la PLTP). Les PC sont distribuées de manière équivalente entre les différentes classes lipoprotéines (**Wiesner et al. 2009**) ce sont les précurseurs de la **lysophosphatidylcholine** (LPC) sous l'action de la LCAT (**Fielding et al. 1972**). Les LPC s'associent préférentiellement aux HDL plutôt qu'aux lipoprotéines à Apo B, ce qui est cohérent avec l'activité préférentielle de la LCAT avec cette classe de lipoprotéine (**Kontush et al. 2007; Wiesner et al. 2009**). La LPC est aussi un produit de réaction de la Lp-PLA2 notamment par l'hydrolyse des PC oxydées des LDL, ce qui en fait des produits pro-inflammatoire et pro-athérogène pouvant servir de biomarqueur de l'inflammation (**Zalewski and Macphee 2005; Huang et al. 2020b**). La concentration en LPC associée aux HDL est dépendante de la technique d'isolement des lipoprotéines. L'isolement des HDL par FPLC est associée à une co-élution de l'albumine avec les HDL. Les LPC ayant une forte affinité avec l'albumine, sont présents en importante quantité lorsque les HDL sont isolées par FPLC ( $\leq 15\%$  du poids en lipide des HDL). À l'inverse, quand l'isolement des HDL est effectué par ultracentrifugation, les niveaux de LPC sont plus bas (0,7-0,8% du poids en lipides des HDL) (**Wiesner et al. 2009; Camont et al. 2013**). Les HDL transportent aussi des glycérophospholipides membranaires présentant une activité antioxydante, les **plasmalogènes**. Deux principaux plasmalogènes sont transportés par les HDL, **PC-plasmalogène** et les **PE-plasmalogène** (**Wiesner et al. 2009**). Les plasmalogènes sont retrouvés également dans la membrane des érythrocytes et possèdent une structure capable de résister au stress oxydant (**Maeba et al. 2002; Maeba and Ueta 2003; Fahy et al. 2005**). Les HDL véhiculent dans leur lipidome, des phospholipides chargés négativement en faible concentrations, comme les **phosphatidylinositols** (PI), les **phosphatidylsérines** (PS), les **phosphatidylglycérols** (PG), les **acides phosphatidiques** (PA) et les **cardiolipines**. Ces différents phospholipides impactent significativement la charge nette des HDL (**Davidson et al. 1994; Kontush et al. 2015**). Les PS et les PA sont davantage présents dans les HDL3c (petite et dense) qu'au sein des HDL2 (large HDL). Aussi, les PS et PA semblent participer



aux propriétés anti-apoptotiques, anti-inflammatoires, antioxydantes et antithrombotiques des HDL3 petites et denses (Camont et al. 2013; Darabi et al. 2022). La concentration des différentes classes de phospholipides (PC, LPC, PE, PI, PA, PG et PS) a tendance à être augmentée en fonction de l'augmentation de la densité hydratée des HDL. Cette variation montre bien l'hétérogénéité existante dans la composition en phospholipides et sphingolipides des HDL selon leur densité (Wiesner et al. 2009; Camont et al. 2013). Également, en pourcentage total de lipides, les PC sont réparties entre les différentes sous-classes de HDL alors que les PS, PA, PE et PI sont toujours plus élevées en fonction de la densité croissante des HDL (Kontush et al. 2015).

Les **sphingomyélines** représentent les **sphingolipides** majoritaires des HDL (Tableau 5) et celles-ci participent à la réduction de la fluidité membranaire (Rye et al. 1996; Wiesner et al. 2009; Kontush et al. 2013). Contrairement aux phospholipides chargés, la sphingomyéline est diminuée en fonction de l'augmentation de la densité des HDL (Kontush et al. 2007; Camont et al. 2013). Les **céramides** constituent les deuxièmes sphingolipides des HDL issus de l'hydrolyse des sphingomyélines. Cependant, les céramides et les sphingomyélines sont transportés majoritairement par les LDL. Les céramides jouent un rôle clé en tant que molécule de signalisation (Taha et al. 2006; Wiesner et al. 2009). La concentration en céramide et en sphingomyéline diminue en fonction de la croissance de la densité hydratée des HDL, ils sont ainsi plus abondants dans les HDL2 (Camont et al. 2013; Kontush et al. 2015).

La **sphingosine-1-Phosphate** (S1P) est un lysosphingolipide avec des propriétés bioactives de par sa capacité à interagir avec les récepteurs S1P (S1PR1 à S1PR5) couplés aux protéines G (Hla and Maciag 1990; Sattler and Levkau 2009; Levkau 2015). Cette sphingosine est issue d'un céramide sous l'action de la céramidase, puis elle est phosphorylée par la sphingosine kinase (Maceyka and Spiegel 2014). La S1P est transportée majoritairement par des protéines chaperonnes comme l'Apo M, en conséquence la majorité de S1P circulante est associée aux HDL (Scherer et al. 2011; Christoffersen et al. 2011). Aussi, l'Apo M étant principalement associée aux HDL3 (Davidson et al. 2009), cette sous-classe de HDL est également enrichie en S1P (Kontush et al. 2007, 2015). Les concentrations de sphingosine-1-phosphate sont élevées dans la circulation sanguine et lymphatique, mais elles sont basses dans les tissus du fait que la S1P est rapidement dégradée (Maceyka and Spiegel 2014). Le complexe S1P-Apo M et HDL confèrent des propriétés vasculo-protectrices à ces nanoparticules (Christoffersen et al. 2011; Yao Mattisson and Christoffersen 2021).

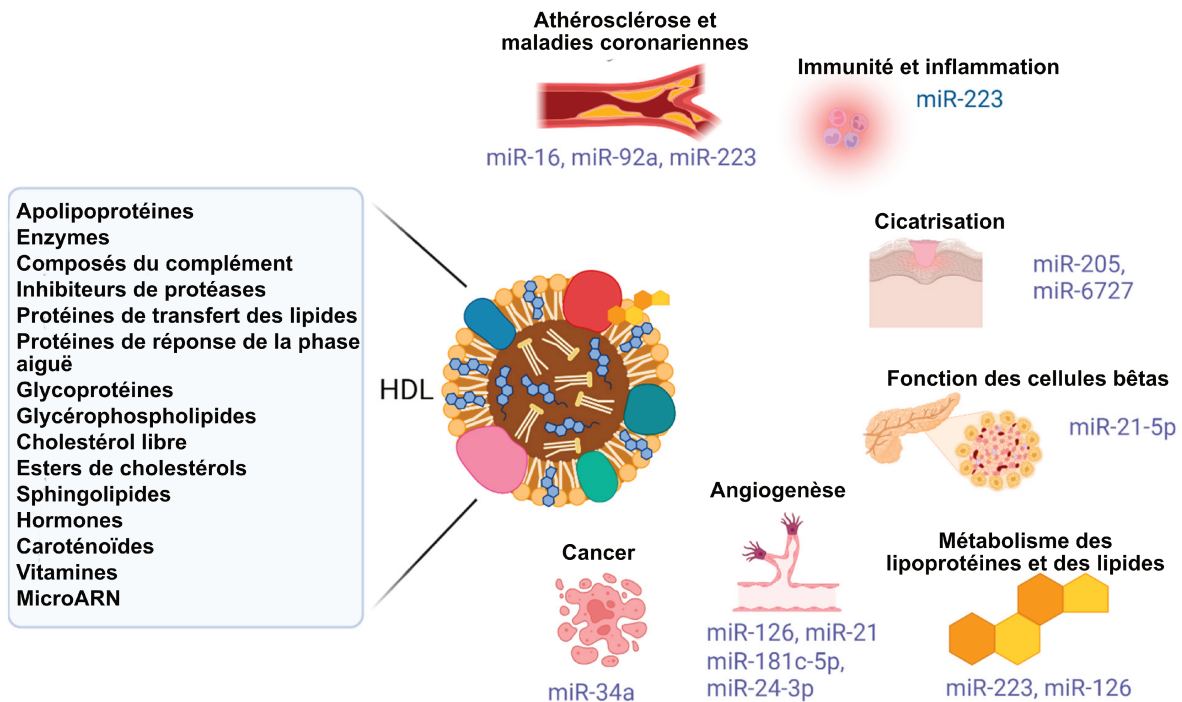
La fonction principale des HDL étant le transport inverse du cholestérol, le **cholestérol libre (FC)** est le stéroïde majoritaire des HDL. Néanmoins, les HDL transportent aussi d'autres stéroïdes minoritaires comme certains oxystérols (**Burkard et al. 2007; Wiesner et al. 2009**). Tout comme les phospholipides et les sphingolipides, le cholestérol libre se localise au niveau de la membrane des HDL, augmentant ainsi leur fluidité membranaire (**Brewer 1981; Yetukuri et al. 2010; Kontush et al. 2013**). La concentration en cholestérol libre membranaire des HDL étant inversement associée à la densité croissante des HDL, ce sont donc les HDL2 qui sont les plus riches en FC (**Kontush et al. 2015**).

Les **esters de cholestérol** sont les produits de l'estérification du cholestérol par la LCAT (**Fielding et al. 1972**). Alors que la concentration en FC diminue avec la croissance de la densité des HDL, celles des esters de cholestérol reste identique entre les différentes sous-populations de HDL (**Wiesner et al. 2009; Kontush et al. 2015**). Aussi, ces esters de cholestérol transportés au cœur des HDL, sont ensuite échangés contre des triglycérides avec les lipoprotéines à Apo B sous l'action de la CETP (**Barter et al. 1982**). Ainsi, les HDL transportent aussi au sein de leur noyau de lipides neutres, des **triglycérides**. Les HDL transportent également différents **lipides mineurs** comme les diacylglycérols, les monoacylglycérols et des acides gras (**Wiesner et al. 2009; Kontush et al. 2013; Christinat and Masoodi 2017**).



#### 4. Les autres composants des HDL

Au-delà de leur composition lipidique et protéique, les HDL peuvent aussi se lier à des courts fragments d'acide nucléique et de petits ARN. Les petits ARN, les plus étudiés associées aux HDL sont les microARN (miR) qui sont des ARN non codant, d'une taille de 18 à 22 nucléotides. Ces microARN reconnaissent les ARNm par appariement de bases et régulent leur expression (Berezikov et al. 2006). Les HDL vont ainsi transporter ces miRs dans la circulation sanguine vers différentes cellules cibles selon leur fonction attendue. Ces miRs transportés par les HDL ont différentes origines et participent à divers processus. Les miRs les plus abondants qui sont impliqués dans différentes physiopathologies comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, le cancer et l'inflammation sont notamment les miR-16, miR24, miR-33 et le miR-223 (Figure 20) (Vickers et al. 2011; Vickers and Michell 2021; Graham 2023). Les HDL incorporent aussi des vitamines, notamment des caroténoïdes et de la vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol). Les HDL agissent en tant que transporteur pour ces vitamines liposolubles, assurant leur disponibilité au niveau de leurs cellules cibles, notamment les pneumocytes et l'épithélium pigmentaire rétinien (Goulinet and Chapman 1997; Kolleck et al. 1999; Li et al. 2022).



**Figure 20. Les composants des HDL et l'impact des microARN transportés par les HDL (adaptée de (Graham 2023)).**

Les HDL transportent ainsi une multitude de protéines, de lipides ainsi que diverses autres molécules contribuant à leurs fonctions pléiotropes.

### C. Les propriétés pléiotropes des HDL

En plus de leur fonction principale de transport inverse du cholestérol leur conférant ainsi une fonction antiathérogène, les HDL présentent de nombreuses propriétés, notamment anti-inflammatoires, antioxydantes, anti-apoptotiques ou encore anti-infectieuses (Figure 21).

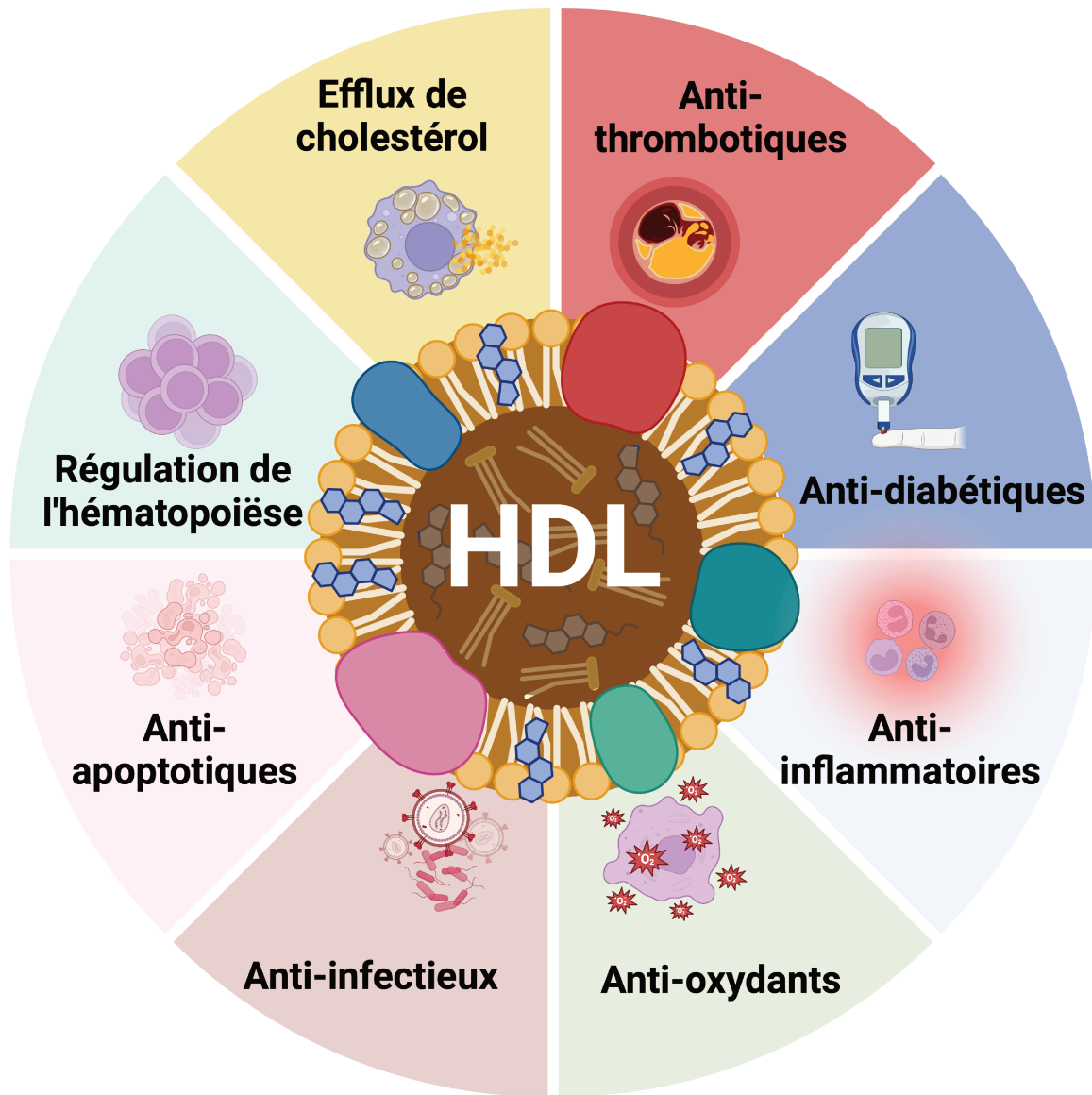
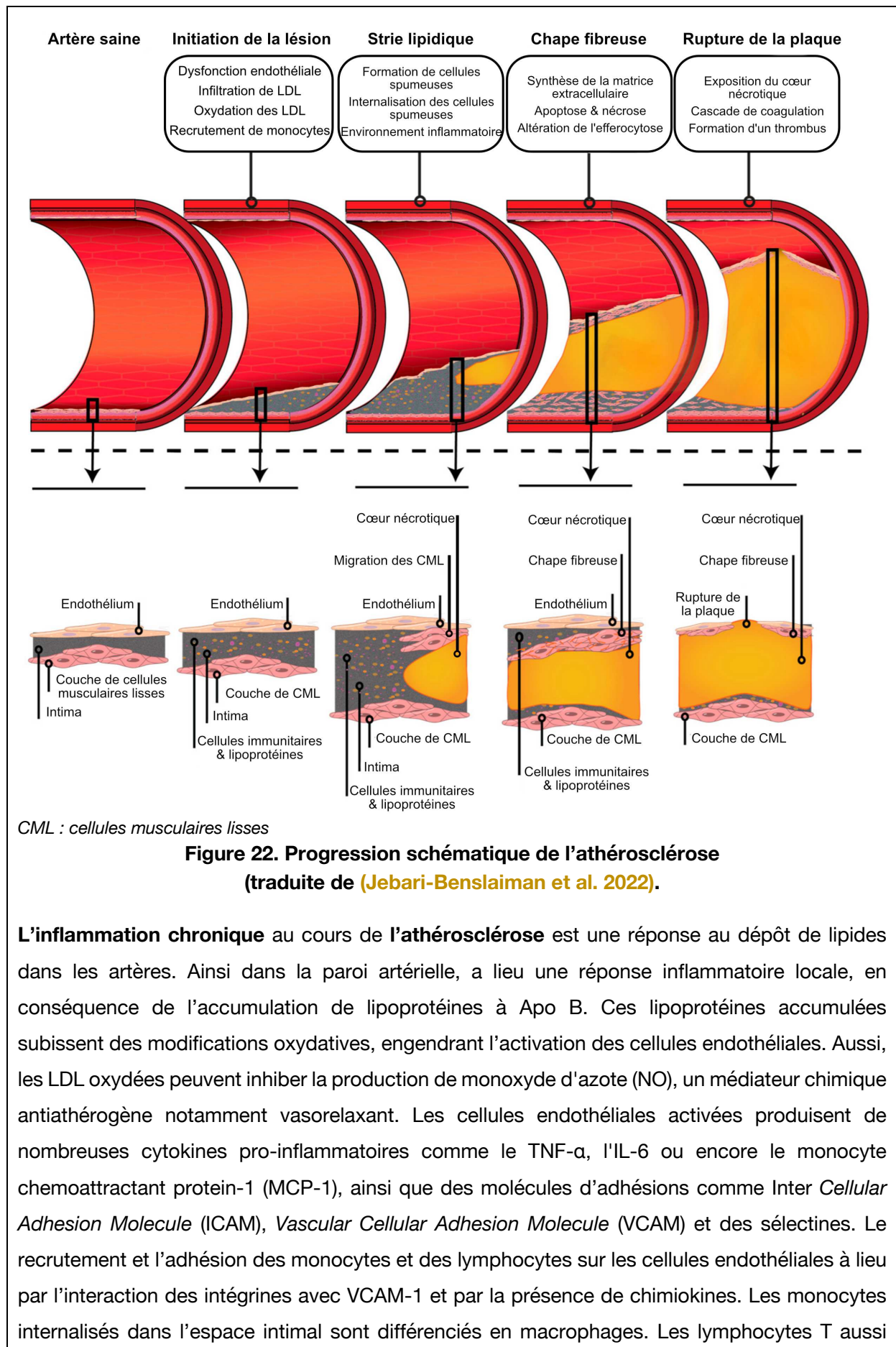


Figure 21. Les propriétés pléiotropes des HDL (adaptée de (Chapman 2022)).



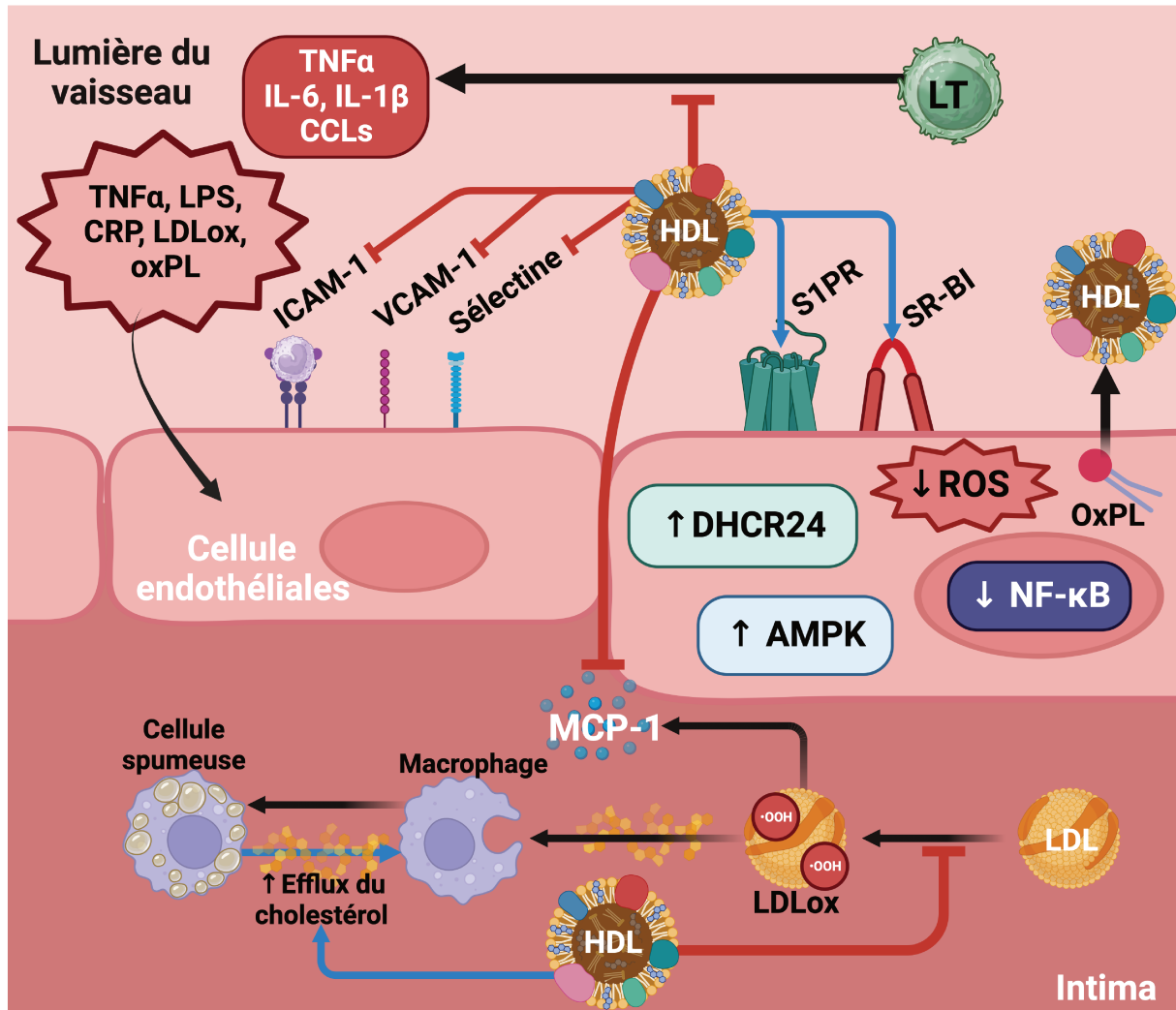
**Figure 22. Progression schématique de l'athérosclérose**  
(traduite de (Jebari-Benslaiman et al. 2022).

**L'inflammation chronique** au cours de **l'athérosclérose** est une réponse au dépôt de lipides dans les artères. Ainsi dans la paroi artérielle, a lieu une réponse inflammatoire locale, en conséquence de l'accumulation de lipoprotéines à Apo B. Ces lipoprotéines accumulées subissent des modifications oxydatives, engendrant l'activation des cellules endothéliales. Aussi, les LDL oxydées peuvent inhiber la production de monoxyde d'azote (NO), un médiateur chimique antiathérogène notamment vasorelaxant. Les cellules endothéliales activées produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-6 ou encore le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), ainsi que des molécules d'adhésions comme *Inter Cellular Adhesion Molecule* (ICAM), *Vascular Cellular Adhesion Molecule* (VCAM) et des sélectines. Le recrutement et l'adhésion des monocytes et des lymphocytes sur les cellules endothéliales a lieu par l'interaction des intégrines avec VCAM-1 et par la présence de chimiokines. Les monocytes internalisés dans l'espace intimal sont différenciés en macrophages. Les lymphocytes T aussi

s'accumulent dans l'intima, exerçant des effets délétères favorisant l'athérogénèse et induisant une production massive de cytokines pro-inflammatoires. Les LDL hautement oxydées sont phagocytées par les macrophages causant la formation des cellules spumeuses. L'importante modification des LDL est causée notamment par des espèces pro-oxydantes comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les macrophages et les cellules endothéliales, mais aussi par des enzymes telles que la myéloperoxydase et les phospholipases. La formation des cellules spumeuses est médiée par le récepteur scavenger, SR-A et le CD36 dont les expressions sont régulées par le *Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ* (PPAR $\gamma$ ). Les cellules spumeuses vont s'accumuler et se charger progressivement en LDL oxydées, contribuant à la formation de strie lipidique. Les cellules musculaires résidant dans la média vont migrer vers la plaque intinale en faveur de l'environnement inflammatoire causé par la sécrétion des cytokines. Cet environnement inflammatoire et oxydant favorise la progression de la lésion avec les processus de nécrose et d'apoptose des cellules musculaires lisses et les macrophages. Les débris cellulaires s'accumulent dans la plaque pour former le noyau nécrotique de l'athérome en raison d'une déficience du processus d'élimination des cellules mortes. Les plaques athérosclérotiques peuvent par la suite se calcifier. Durant le processus d'athérosclérose, la plaque d'athérome en croissance peut conduire à l'obstruction de la lumière artérielle pouvant produire une ischémie. La plaque peut également se rompre entraînant la formation d'un thrombus (Lusis 2000; Libby et al. 2019).

## 1. Les propriétés anti-inflammatoires

L'une des premières fonctions pléiotropes associées aux HDL est leur capacité à inhiber l'inflammation. Ces propriétés anti-inflammatoires agissent à différents niveaux, notamment : la réduction de la production de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales, l'inhibition de la voie *Nuclear Factor kappa-B* (NF- $\kappa$ B), la clairance des lipides oxydés pro-inflammatoires ainsi qu'une action directe sur les leucocytes (monocytes, lymphocyte T et neutrophiles) (Figure 23).



AMPK : protéine kinase AMP dépendante, CCLs : chémokines ligands, CRP : protéine C-réactive, DHCR24 : 3- $\beta$ -hydrostéroïde-delta 24-réductase, LDL : lipoprotéine de basse densité, LDLox : LDL oxydée, LPS : lipopolysaccharides, LT : lymphocyte T, MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1, NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B, OxPL : phospholipide oxydé, ROS : espèces réactives de l'oxygène, S1PR : Sphingosine 1 phosphate récepteur, SR-BI : scavenger receptor B1

**Figure 23. Principales activités anti-inflammatoires des HDL dans les cellules endothéliales et les leucocytes (adaptée de (Barter et al. 2004; Kontush and Chapman 2011)).**

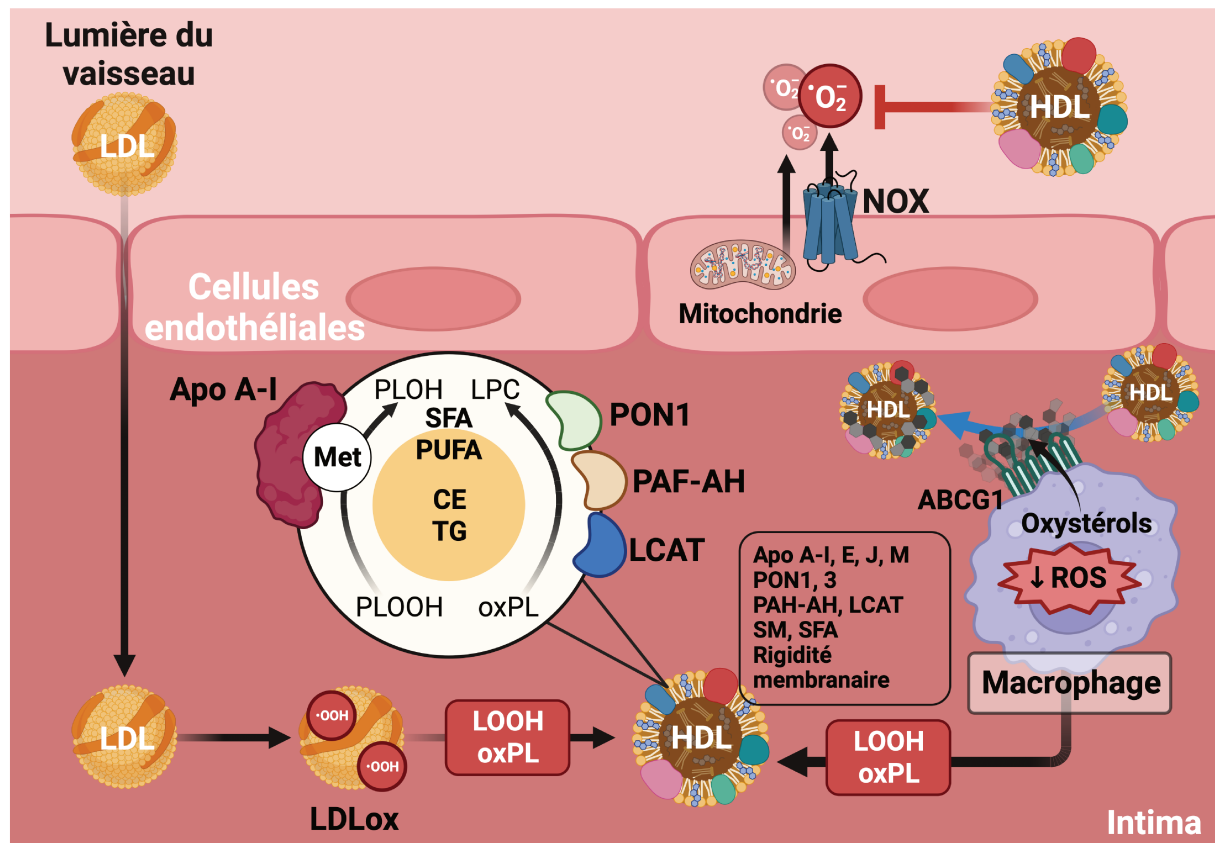
Les HDL exercent leurs propriétés anti-inflammatoires notamment par l'interaction avec le récepteur SR-B1 et les récepteurs S1PR. Les HDL activent la voie PI3-kinase/Akt conduisant à la synthèse de monoxyde d'azote qui inhibe la production de molécules d'adhésions (ICAM, VCAM, E-sélectine) à la surface des cellules endothéliales sous l'action de divers stimuli (TNF- $\alpha$ , LDL oxydée, endotoxine). (Cockerill et al. 1995; Calabresi et al. 1997; Robbesyn et al. 2003; Kimura et al. 2006). Lorsque les HDL interagissent avec SR-B1, une cascade de signalisation inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B se produit (Robbesyn et al. 2003; Grao-Cruces et al. 2022). Aussi, la liaison des HDL à SR-B1 induit la production de deux enzymes qui sont anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, la 3-bêta-hydrostéroïde-delta 24-réductase (DHCR24) et de l'hème-oxygénase-1 (Wu et al. 2013). Les HDL réduisent la production de ROS intracellulaires et inhibent l'activité du protéasome. Elles réduisent également la dégradation de la protéine modulatrice de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, induite par les LDLox (Robbesyn et al. 2003; Grao-Cruces et al. 2022). Aussi, les HDL exercent une activité anti-inflammatoire au niveau des macrophages, en diminuant leur production de cytokines pro-inflammatoires issues des voies TLR. Cette répression est contrôlée par l'activation de l'expression de l'*Activating Transcription Factor 3* (ATF3) qui est un répresseur transcriptionnel induit par les HDL (De Nardo et al. 2014). L'Apo A-I des HDL réduit aussi le chimiotactisme des monocytes, en limitant la production de MCP-1, ainsi que le relargage de molécules d'adhésion solubles (sICAM-1, sVCAM-1) par les monocytes THP-1 lorsque ceux-ci sont activés par les LPS. Ces nanoparticules réduisent également la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire (THP-1) en inhibant notamment la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau des macrophages (Wang et al. 2010). De plus, les HDL réduisent l'activation des monocytes par les lymphocytes T, en inhibant la production de cytokine pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et de chimiokines (*chemokine ligand* (CCL)3 et CLL4) induites par le contact de LT avec les monocytes (Hyka et al. 2001; Gruaz et al. 2010). Enfin, les HDL transportent des enzymes comme la LCAT, LpPLA2, PON1 qui sont des enzymes participant à l'élimination de lipides oxydés des cellules endothéliales, macrophages et LDL oxydées (Watson et al. 1995; Shih et al. 1998; Van Lenten et al. 2001).

Les différentes activités anti-inflammatoires des HDL sont associées à la composition de leur protéome et leur lipidome (Kontush et al. 2013; Davidson et al. 2022). Ainsi, les Apo A-I, A-IV participent aux effets anti-inflammatoires des HDL (Hyka et al. 2001; Recalde et al. 2004). Au sein de la particule HDL, l'Apo A-I semble contribuer majoritairement aux fonctions anti-inflammatoires de ces lipoprotéines. L'Apo A-I est en effet suffisante pour inhiber l'activation des neutrophiles induite par les LT ainsi que le recrutement des monocytes (Hyka et al. 2001; Wang et al. 2010; Murphy et al. 2011). La composition lipidique joue



également une fonction importante sur les propriétés anti-inflammatoires des HDL en modulant notamment la fluidité membranaire facilitant l'accès ou non à l'Apo A-I. De plus, la présence de S1P contribue également à la propriété anti-inflammatoire des HDL lorsqu'elle interagit avec S1PR1 et 3 (Kontush et al. 2007, 2013). L'hétérogénéité structurale des HDL est également associée à une hétérogénéité fonctionnelle. Les HDL discoïdales possèdent moins d'effets anti-inflammatoires que les HDL sphériques (Baker et al. 1999). De plus, les petites et denses HDL (HDL3) semblent exercer des propriétés anti-inflammatoires plus efficaces que les grosses particules de HDL (HDL2), ceci pouvant provenir de différences du protéome et du lipidome entre les deux types de particules (Kontush et al. 2007; Davidson et al. 2009; Camont et al. 2013).

## 2. Les propriétés antioxydantes



Apo : apolipoprotéine, LOOH : lipides peroxydés ; NOX : NADPH oxydase ; oxPL : phospholipides oxydés, PAF-AH : Platelet-activating factor acetyl hydrolase, PLOOH : phospholipides peroxydés, PUFA : acide gras polyinsaturé, SFA : acide gras saturé,

**Figure 24. Principales activités antioxydantes des HDL (adaptée de (Kontush and Chapman 2011)).**

Les propriétés antioxydantes des HDL font partie intégrante de leur fonction vasculo-protectrice (Figure 24).

Au cours de l'athérosclérose, l'accumulation des lipoprotéines à Apo B dans l'intima et leurs modifications oxydatives causées par un stress oxydant local constituent des événements clés dans le développement de la pathologie (Stocker and Keaney 2004; Libby

**et al. 2019**). Les lipides et les apolipoprotéines des LDL se retrouvent sujets aux modifications oxydatives par les espèces pro-oxydantes comme les ROS ou les espèces réactives de l'azote, les lipoxygénases ou encore la myéloperoxydase. Ces différents processus oxydatifs causent l'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques et l'oxydation de l'Apo B (**Figure 24**) (**Stocker and Keaney 2004**). Les HDL possèdent alors la capacité d'inhiber les phénomènes oxydatifs affectant les LDL (**Figure 24**).

Les HDL inhibent l'oxydation des LDL induite par les radicaux libres. Cette inhibition s'opère par un transfert des peroxydes lipidiques des LDL vers les HDL. Les phospholipides peroxydés (PLOOH) peuvent être transférés directement entre la monocouche de phospholipides de la surface des LDL à celles des HDL. Le transfert des PLOOH et des peroxydes d'ester de cholestérol (CEOOH) vers les HDL peut être accéléré par la CETP. Aussi, les lipides peroxydés peuvent être transférés aux HDL sous l'action de la PLTP des TRL et des cellules endothéliales (**Christison et al. 1995**). Ainsi, les HDL représentent les transporteurs majoritaires de lipides peroxydés dans la circulation sanguine (**Bowry et al. 1992**). On peut noter que le transfert des lipides oxydés aux HDL est dépendant de la fluidité membranaire des particules. Le transfert des lipides peroxydés et la capacité des HDL à limiter l'oxydation des LDL diminuent lorsque la rigidité membranaire augmente. Cette rigidité membranaire est étroitement dépendante de la composition en sphingomyéline, cholestérol libre et acides gras saturés ou insaturés de la particule par rapport à sa concentration en phospholipides (**Zerrad-Saadi et al. 2009**).

Après leur transfert aux HDL, ces lipides peroxydés (LOOH) sont inactivés par réduction des hydroxydes au cours d'une réaction d'oxydoréduction (**Figure 24**) (**Garner et al. 1998; Zerrad-Saadi et al. 2009**). L'inactivation des lipides peroxydés des HDL se fait majoritairement par l'Apo A-I, avec une implication notable des résidus méthionines (**Figure 24**). D'autres protéines composant les HDL comme l'Apo A-II, l'Apo A-IV, l'Apo E, l'Apo M ainsi que les enzymes telles que PON1, LpPLA2, la LCAT et GSPx peuvent également inactiver les lipides peroxydés (**Davidson et al. 2009**). Au-delà de l'inhibition des lipides peroxydés, les enzymes antioxydantes composant les HDL (LCAT, PON1 et LpPLA2) hydrolysent les phospholipides oxydés à courtes chaînes en lysophospholipides et acides gras libres ou en aldéhydes (**Figure 24**) (**Aviram et al. 1998; Van Lenten et al. 2001**). Enfin, les lipides peroxydés et les hydroxydes lipidiques sont éliminés de la circulation sanguine par le foie, via l'interaction avec le récepteur SR-B1 (**Christison et al. 1996**). Les HDL transportent également des vitamines, comme l' $\alpha$ -tocophérol, qui participent également aux propriétés antioxydantes des HDL (**Bowry et al. 1992; Goulinet and Chapman 1997**).



La distribution des protéines composant les HDL est hétérogène entre les différentes sous-populations de HDL, engendrant une variation de leur capacité protectrice. Les HDL petites et denses (HDL3) sont enrichies en paraoxonase, PLTP, LpPLA2 et se retrouvent plus antioxydantes que les grosses particules de HDL (HDL2) (Davidson et al. 2009; Zerrad-Saadi et al. 2009).

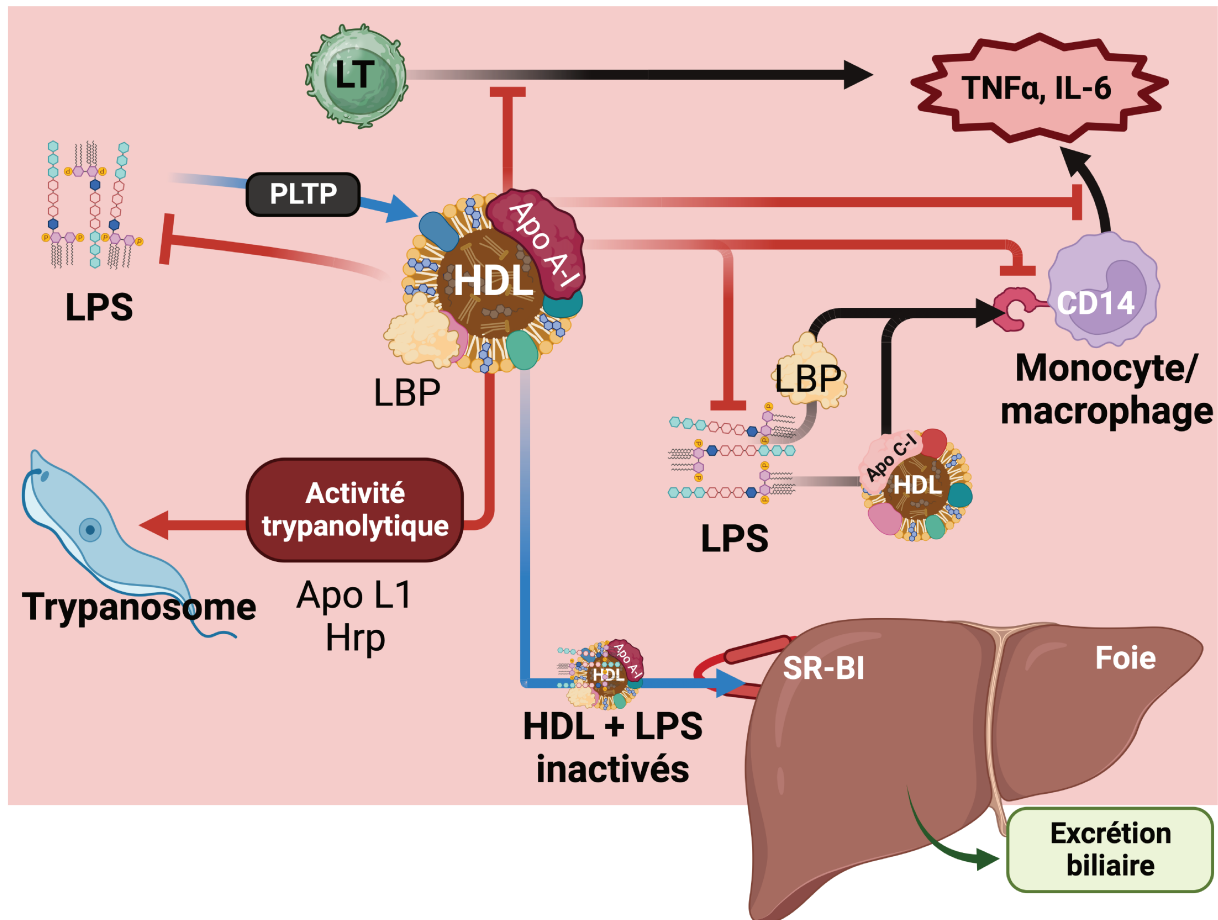
### 3. Les propriétés anti-apoptotiques

Ces nanoparticules exercent également une fonction cytoprotectrice sur les cellules endothéliales et les macrophages. La protection de ces cellules par les HDL se fait grâce à l'efflux du cholestérol oxydé cellulaire. En effet, les macrophages et les cellules endothéliales sont plus sujets à l'apoptose lorsqu'elles sont chargées en cholestérol libre ou en LDL oxydées. Ainsi, les HDL favorisent l'efflux des lipides oxydés des macrophages et des cellules endothéliales via ABCG1 et ABCA1, protégeant ainsi ces cellules de l'apoptose (Suc et al. 1997; Terasaka et al. 2008; Yvan-Charvet et al. 2010). Aussi, les propriétés antioxydantes des HDL contribuent à l'effet cytoprotecteur de ces lipoprotéines, notamment par la réduction de la production de ROS intracellulaires (Robbesyn et al. 2003; Yvan-Charvet et al. 2010). Dans l'espace intracellulaire, les HDL jouent un rôle clé dans l'apoptose car elles préservent l'intégrité mitochondriale, notamment en inhibant la libération du cytochrome c. De plus, elles réduisent la fragmentation de l'ADN en bloquant les voies de signalisation cytotoxique induites par des agents toxiques ou des LDL oxydées. Les HDL inhibent aussi les voies caspases dépendantes ou indépendantes initiatrices du processus apoptotique (Suc et al. 1997; Terasaka et al. 2008; De Souza et al. 2010; Yvan-Charvet et al. 2010).

Ces différentes fonctions cytoprotectrices sont assurées par certains composants des HDL comme l'Apo A-I et l'Apo E (DeKroon et al. 2003; De Souza et al. 2010; Yvan-Charvet et al. 2010; Atehortua et al. 2023). Les effets protecteurs de l'Apo A-I et l'Apo E sont associés à leur capacité à réaliser l'efflux des lipides oxydés ou à agir sur les voies de survie intracellulaires. On peut noter également que l'Apo J participe directement à l'efferocytose des cellules apoptotiques et à l'élimination des débris cellulaires (Cunin et al. 2016). La présence de l'Ecto-F1-ATPase/P2Y1 récepteur sur les cellules endothéliales (HUVEC) et son activation par l'Apo A-I conduit à l'inhibition de l'apoptose de ces cellules (Radojkovic et al. 2009). Le complexe Apo M-S1P porté par les HDL participe également à leurs propriétés anti-apoptotiques. Les HDL Apo M-S1P délivrent la S1P à ses récepteur spécifiques S1PR1 et S1PR3 menant à l'activation de la voie PI3K/Akt et l'*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) entraînant une inhibition de l'apoptose (Kimura et al. 2003; Ruiz et al. 2017). Les HDL petites et denses (HDL3) enrichies en ces différentes protéines et lipides cités précédemment,

présentent davantage de propriétés anti-apoptotiques que les HDL2 (Kontush et al. 2007; De Souza et al. 2010; Perségol et al. 2018).

#### 4. Les propriétés anti-infectieuses



La flèche bleue représente le « transport inverse des LPS ». Les flèches rouges représentent les effets anti-infectieux des HDL. Les flèches noires représentent les voies inflammatoires.

**Figure 25. Principales activités anti-infectieuses des HDL (adaptée de (Gautier and Lagrost 2011; Kontush and Chapman 2011)).**

Au cours d'une infection, les HDL présentent des propriétés anti-infectieuses malgré une forte diminution de la concentration circulante en HDL-C. Le LPS est l'endotoxine majoritaire des bactéries Gram négatives tandis que l'acide lipotéichoïque (LTA) est l'endotoxine de la plupart des bactéries Gram positives. Ces deux endotoxines engendrent des modifications similaires du métabolisme lipidique conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoire et *in fine* à un sepsis (Wicken and Knox 1975; Grunfeld et al. 1999; Schwandner et al. 1999).

La majorité du LPS circulant est associée aux différentes classes de lipoprotéines. Les HDL sont capables d'inactiver le LPS circulant et possèdent une affinité plus importante d'interaction avec le LPS que les autres lipoprotéines. De plus, les HDL sont aussi capables d'inactiver le LTA circulant, mais le mécanisme n'a pas encore été élucidé (Wurfel et al. 1994;

**Grunfeld et al. 1999; Levels et al. 2001**). L'inactivation du LPS par les HDL implique une réduction de la réponse pro-inflammatoire marquée par une réduction de la libération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-8) et de l'expression de CD14 à la surface des monocytes, principal récepteur du LPS (**Figure 25**) (**Pajkrt et al. 1996**). Les HDL sont aussi capables d'inhiber l'activation des gènes de l'interféron de type 1, un immuno-régulateur antiviral impliqué dans la réponse au pathogène induite par le LPS (**Hirotsu et al. 2005; Suzuki et al. 2010**).

L'inactivation du LPS se fait principalement et directement par l'Apo A-I. L'Apo A-I se lie au LPS et le neutralise. De plus, une diminution de la libération de TNF- $\alpha$  par les macrophages est observée en présence de LPS et d'Apo A-I (**Henning et al. 2011**). Aussi, *in vivo* chez des souris soumises à des injections de LPS, la surexpression d'Apo A-I atténue la production de TNF- $\alpha$ , IL-6, d'IL-1 $\beta$ , l'expression de CD14 des monocytes et réduit les dommages pulmonaires des animaux (**Figure 25**) (**Li et al. 2008**). L'Apo C-I est également capable de se lier au LPS. Cette apolipoprotéine augmente la réponse pro-inflammatoire en présentant le LPS aux CD-14/TLR4 (**Berbée et al. 2010**).

Les HDL transportent également des protéines de transfert, comme la protéine de liaison au LPS (LBP, *LPS binding protein*). La LBP transfère le LPS au CD14 ou à une autre HDL, engendrant une activation des neutrophiles et une inactivation du LPS (**Figure 25**) (**Wurfel et al. 1994, 1995; Gutsmann et al. 2001**). La PLTP possède également la capacité à transférer le LPS aux lipoprotéines dans la circulation sanguine (**Hailman et al. 1996**). La PLTP joue un rôle clé dans le « transport inverse des lipopolysaccharides ». La PLTP favorise la désagrégation et la liaison du LPS aux HDL. Ainsi, cette action de la PLTP permet de moduler l'activation des macrophages par le LPS (**Figure 25**) (**Gautier and Lagrost 2011**). Enfin, les LPS transportés par les HDL sont captés via SR-B1 par le foie et sont éliminés dans la sécrétion biliaire. De plus, SR-B1 favorise la production de glucocorticoïdes en situation de sepsis bactérien, ce qui participe également à la réponse anti-inflammatoire (**Cai et al. 2008**).

Les HDL présentent donc de nombreuses propriétés protectrices qui sont conférées par leur structure et leur composition. Ces propriétés protectrices sont d'autant plus marquées que les particules sont riches en protéines, comme c'est le cas pour les HDL petites et denses. Cependant, l'ensemble de ces fonctions protectrices peut être altéré au cours d'une inflammation chronique ou aiguë tel que les infections virales ou bactériennes.

## D. Modification des HDL en situation pathologique

L'inflammation chronique est une inflammation de bas grade qui perdure dans le temps (plusieurs mois) pouvant conduire au développement de maladie chronique comme le diabète de type 2 ou les maladies cardiovasculaires. L'inflammation aiguë est associée à une réponse de phase aiguë qui constitue un mécanisme de défense mis en place par l'organisme afin de lutter contre l'infection. Cette réponse est principalement sous le contrôle des cytokines pro-inflammatoires endogènes comme l'interleukine-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou encore l'IL-6. Au-delà des symptômes, ces cytokines provoquent également la synthèse de protéines de la phase aiguë par le foie (**Cem and Irving 1999**). Les HDL participent à la réponse contre l'inflammation, mais avec pour conséquence un bouleversement de leur structure et de leurs fonctions par ces processus inflammatoires.

### 1. Protéome des HDL durant l'inflammation

La structure des HDL se retrouve altérée au cours de l'inflammation. En effet, ces nanoparticules subissent un remodelage causé par une modification de leur protéome par des protéines de la phase aiguë.

#### (1) Sérum amyloïde A

La sérum amyloïde A ou SAA est une apolipoprotéine échangeable qui représente la principale protéine de la phase aiguë essentiellement d'origine hépatique (**Linke et al. 1975; Uhlir and Whitehead 1999**), exprimée sous quatre isoformes : SAA-1, SAA-2, SAA-3 et SAA-4. Chez l'Homme, on retrouve deux SAA de la phase aiguë (A-SAA) produites qui sont SAA-1 et SAA-2, ainsi qu'une forme constitutive, la SAA-4. (**Kluve-Beckerman et al. 1991; Steel et al. 1993; Uhlir and Whitehead 1999**). La sécrétion de SAA dans la circulation peut être multipliée par 1000 pendant la réponse de la phase aiguë, induite par les cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  (**De Buck et al. 2016**). Contrairement aux autres SAA, la SAA-4 est constitutivement présente dans la circulation (**Whitehead et al. 1992; Steel et al. 1993**). Les SAA se retrouvent associées aux HDL, majoritairement aux HDL3, et dans une moindre mesure aux LDL et VLDL. Les A-SAA (*acute SAA*, SAA-1 et SAA-2) s'associent aux HDL en substituant l'Apo A-I de ces particules, devenant ainsi les apolipoprotéines majoritaires des HDL (**Benditt and Eriksen 1977; Coetzee et al. 1986; Kotani et al. 2009; Wilson et al. 2018**). Dans les lipoprotéines à Apo B, l'implémentation de la SAA est favorisée par l'action de la CETP où elle contribue potentiellement au développement des maladies cardiovasculaires (**Wilson et al. 2018**). De plus, une élévation de la concentration en SAA est donc associée à une augmentation du risque de mortalité associée à de nombreuses pathologies et plus particulièrement aux maladies cardiovasculaires (**Mayer et al. 2019**). En

effet, les HDL enrichies en SAA perdent leur fonction anti-inflammatoire et deviennent pro-inflammatoires (**Schuchardt et al. 2019**).

## (2) Alpha-1-acide glycoprotéine

L'alpha-1-acide glycoprotéine ou l'orosomucoïde (AGP-1) est une protéine glycosylée à chaîne unique. Sa glycosylation est modifiée en contexte inflammatoire, conduisant à une modification de son catabolisme et de son interaction avec les médicaments. L'AGP-1 est un immunomodulateur (**Hochepped et al. 2003; Gornik et al. 2009; Fernandes et al. 2015**) synthétisé principalement par le foie avec une concentration sérique multipliée de deux à cinq fois au cours de la réponse inflammatoire à la phase aiguë. Sa production est stimulée par les cytokines et les glucocorticoïdes. Cette protéine est retrouvée associée au HDL au cours de la réponse à la phase aiguë et elle est notamment retrouvée augmentée dans les HDL chez des patients souffrant de maladies cardiovasculaires (**Vaisar et al. 2007; Kontush et al. 2015**). Une concentration élevée en AGP-1 est d'ailleurs associée à un développement de la plaque d'athérome et aux accidents vasculaires cérébraux (**Berntsson et al. 2016**).

## (3) Alpha-1-antitrypsine

L'alpha-1 antitrypsine (AAT) est une protéine de la phase aiguë qui se caractérise par sa fonction d'inhibiteur de l'élastase des neutrophiles qui est une protéase extracellulaire. L'AAT est une serpine synthétisée principalement par le foie avant d'être sécrétée dans le plasma (**Schroeder et al. 1985**). Durant la phase aiguë, les concentrations en AAT sont augmentées par un facteur de deux à quatre sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires et du LPS. L'AAT permet de réguler la dégranulation des neutrophiles et ainsi diminuer l'inflammation pendant la phase aiguë (**Knoell et al. 1998; Cem and Irving 1999; Bergin et al. 2014**). L'AAT présente aussi des propriétés anti-apoptotiques, en plus de ses propriétés anti-inflammatoires (**Zhang et al. 2007; Al-Omari et al. 2011**). Les patients déficients en AAT développent des emphysèmes pulmonaires (**Gadek et al. 1981**). Les analyses lipoprotéomiques ont montré l'association de l'AAT avec les HDL, les LDL et les VLDL (**Karlsson et al. 2005a; Vaisar et al. 2007; Sun et al. 2010**).

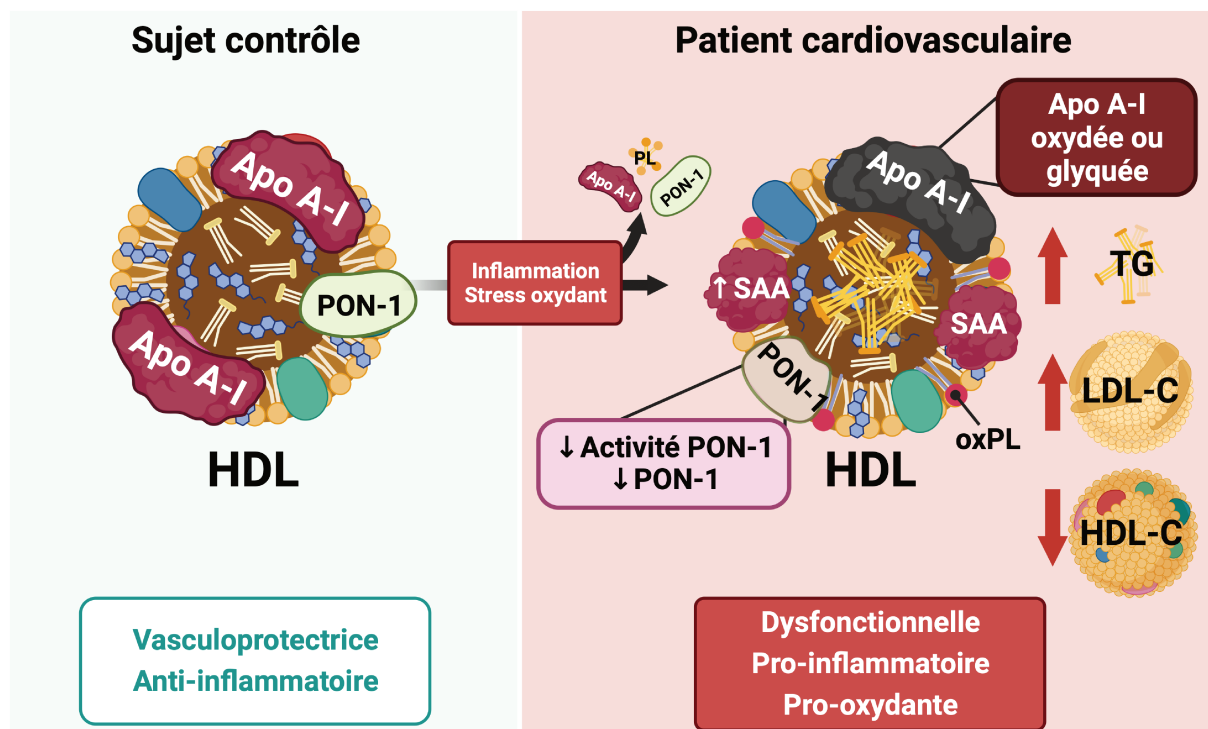
## (4) Les protéines du complément

Les HDL transportent aussi des protéines impliquées dans la régulation du complément. Le complément a pour fonction de favoriser l'élimination des agents pathogènes soit via la liaison des anticorps après leur recouvrement (opsonisation) ou de manière directe (sans implication d'immunoglobulines) (**Sarma and Ward 2011**).

Le complément C3, C4 (les sous-unités : C4a et C4b) et la vitronectine ont été identifiés en association avec les HDL (**Vaisar et al. 2007**). Le **complément C3** est un activateur du complément tant au niveau de l'activation directe, que de l'opsonisation ou

encore de la phagocytose des particules opsonisées (Ricklin et al. 2016). Le **complément C4** participe aussi à l'activation du complément. Le **complément C4a** est issu du clivage du complément C4. Le **fragment C4b** est un activateur majeur des enzymes du complément (Sarma and Ward 2011). La **vitronectine**, quant à elle, est un inhibiteur de l'activation du complément tout comme la **clusterine (Apo J)**. Aussi, la vitronectine accroche et active l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) inhibant ainsi la fibrinolyse au niveau de la matrice extracellulaire (Zhou et al. 2003; Preissner et al. 1990). La vitronectine participe également à l'hémostase en raison de sa capacité à lier l'héparine, neutralisant ainsi l'inhibition de la thrombine (Schvartz et al. 1999). Ces différentes protéines régulatrices du complément sont augmentées chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires excepté la vitronectine qui est plutôt diminuée (Vaisar et al. 2007).

## 2. Inflammation chronique – Diabète, athérosclérose



**Figure 26. Modification de la composition et des propriétés des HDL au cours des maladies cardiovasculaires (adaptée de (Rani and Marsche 2023)).**

Le diabète se définit par une hyperglycémie chronique causée par l'absence ou la résistance à l'insuline (American Diabetes Association 2017). Dans le cas du diabète de type 2, cette hyperglycémie est souvent associée à une dyslipidémie caractérisée par des concentrations basses en HDL-C (< 58 mg/dL), une hypertriglycéridémie et des concentrations élevées en LDL-cholestérol (LDL-C), avec notamment des LDL petites et denses (Figure 26) (Austin et al. 1990; Goldberg 2001). La concentration basse en HDL-C représente en effet un facteur de risque de développement du diabète (Drew et al. 2009), et



au cours du diabète, elle constitue un facteur de risque de développement des maladies cardiovasculaires (Wilson et al. 1988). Paradoxalement, il a été montré dans deux cohortes que des concentrations extrêmement élevées en HDL-C (>77 mg/dL) peuvent être associées à une augmentation de la morbidité au cours des maladies cardiovasculaires (Madsen et al. 2017). Les concentrations basses en HDL-C sont associées à la surproduction de VLDL, à l'activité de la CETP et à celle de la lipase hépatique (Adiels et al. 2005, 2008). Au cours du diabète de type 2 (DT2), la concentration et l'activité de la CETP sont augmentées contribuant ainsi à l'enrichissement des HDL en TG et à la diminution en esters de cholestérol de ces dernières (Figure 26) (Mann et al. 1991; Föger et al. 1996; Rashid et al. 2003). Puis, l'HL métabolise rapidement les HDL riches en TG, générant des petites HDL et de l'Apo A-I libre qui seront rapidement catabolisés (Clay et al. 1992; Rashid et al. 2003; Farbstein and Levy 2012). Feng et al. ont développé un nouveau test reposant sur la capacité des HDL à capter le cholestérol libre lors de la lipolyse des TRL par la LPL. Ces auteurs ont montré que mesurer la capacité de l'efflux du cholestérol représente un meilleur biomarqueur que les niveaux plasmatiques des HDL-C. En effet, les HDL issues de personnes diabétiques ou souffrant de maladies cardiovasculaires présentent une altération de l'efflux du cholestérol (Feng et al. 2020).

Outre le point de vue quantitatif des concentrations en HDL, ces nanoparticules sont également altérées dans leurs structures et leurs fonctions au cours de ces pathologies. Au cours du diabète, les processus de glycation en lien avec l'hyperglycémie sont exacerbés. La glycation est un processus non-enzymatique au cours duquel un sucre se lie à une protéine conduisant à la formation d'un produit avancé de glycation (AGE). De ce fait, les produits avancés de glycation (AGE) se retrouvent augmentés, contribuant à l'augmentation du stress oxydant. Ce stress oxydant entraîne l'oxydation de nombreuses biomolécules conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  par les macrophages, contribuant ainsi au processus inflammatoire. Le processus de glycation est d'autant plus augmenté chez les patients ne contrôlant pas leur hyperglycémie (Nowotny et al. 2015). Ainsi, les phénomènes de glycation et d'oxydation sont des facteurs potentiellement responsables du dysfonctionnement des HDL.

Chez les patients diabétiques de type 2, l'Apo A-I peut subir cette glycation non-enzymatique. De plus, la concentration en Apo A-I glyquée est corrélée positivement avec le développement de la plaque et la sévérité de la maladie cardiovasculaire (Pu et al. 2013). Ce phénomène de glycation peut être causée par une interaction de l'Apo A-I avec du glucose ou avec un  $\alpha$ -oxoaldéhyde (méthylglyoxal, glycoaldéhyde, glyoxal) contribuant à la formation d'AGE (Curtiss and Witztum 1985; Brown et al. 2013). La glycation ou l'oxydation de l'Apo

A-I engendre une perte des fonctions des HDL car celles-ci perdent leurs propriétés anti-inflammatoires du fait de la perte de la capacité à inhiber la production de ROS, de cytokines pro-inflammatoires, de molécules d'adhésion des leucocytes. D'ailleurs, suite à ces modifications, ces HDL deviennent pro-inflammatoires (**Figure 26**) (**Nobecourt et al. 2007; Nobécourt et al. 2010; Liu et al. 2018**). De plus, l'Apo A-I glyquée empêche l'efflux de l'excès de cholestérol des macrophages de la paroi vasculaire, du fait de la diminution de l'interaction entre l'Apo A-I et ABCA1 (**Passarelli et al. 2005; Hoang et al. 2007; Brown et al. 2013; Domingo-Espín et al. 2018**). Les HDL possèdent des propriétés anti-diabétiques. En effet, l'Apo A-I, présent dans les HDL, favorise la captation du glucose par les cellules musculaires en activant l'AMPK (**Han et al. 2007**). De plus, l'Apo A-I est aussi capable de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques (**Cochran et al. 2021**). L'altération de l'Apo A-I engendre une perte de leurs propriétés anti-diabétiques. Aussi, la glycation des HDL notamment de l'Apo A-I, de l'Apo A-II et de la PON-1 induit une perte de leurs fonctions antioxydantes. Cette perte de fonction rend les HDL moins aptes à contrecarrer l'environnement pro-oxydant en situation diabétique. Aussi, les phospholipides et les triglycérides des HDL glyquées sont plus sujets à la peroxydation. De plus, les HDL ont également une capacité réduite à prévenir l'oxydation des LDL. Ces altérations des fonctions des HDL liées à la glycation participent indirectement au développement de l'athérosclérose chez les diabétiques (**Hedrick et al. 2000; Ferretti et al. 2001; Mastorikou et al. 2008; Murakami et al. 2013; Gomez Rosso et al. 2017**). Enfin, les HDL glyquées présentent aussi des concentrations diminuées en S1P, engendrant une perte de leurs propriétés cytoprotectrices (**Brinck et al. 2016**).

En plus de la glycation, l'Apo A-I peut également s'oxyder dans un environnement pro-oxydant que l'on peut rencontrer au cours du diabète et des maladies cardiovasculaires. Comme pour la glycation, les HDL perdent leur capacité à réaliser l'efflux du cholestérol via ABCA1 lorsqu'elles sont oxydées (**Bergt et al. 2004; Martínez-López et al. 2019**). L'Apo A-I oxydée perd également sa capacité à activer la LCAT (**Shao et al. 2008**).

En plus des phénomènes oxydatifs et de glycation, une inflammation chronique de bas grade est associée à la pathologie diabétique (**Figure 27**). Outre les modifications post-traductionnelles des HDL, la composition du protéome et du lipidome de ces nanoparticules est aussi altérée pendant le diabète et les maladies cardiovasculaires. L'altération des HDL au cours de ces pathologies se caractérise par un enrichissement en protéines de la phase aiguë telles que les SAA, et en certaines apolipoprotéines comme les Apo C (II, III). Cet enrichissement des HDL se réalise par la déplétion en apolipoprotéine (A-I, A-II, A-IV, D, E, F,



J et M), en enzymes antioxydantes (PON1, PON3), en la protéine C3 du complément (Figure 27) (Cardner et al. 2020; Kheniser et al. 2020). Par ailleurs, l'hypertriglycéridémie du DT2 accroît l'activité de la CETP, augmentant la concentration en triglycéride dans les HDL. Ces HDL riches en triglycérides subissent une hydrolyse par les lipases hépatiques et endothéliales, réduisant ainsi leur taille (Chapman 2022). Simultanément, l'altération du protéome de ces HDL conduit à leur dysfonction (Cardner et al. 2020; Webb 2021), entraînant la perte de leurs fonctions d'efflux de cholestérol, anti-inflammatoire, antioxydante, anti-apoptotique, anti-protéase, conduisant à leurs dysfonctionnement. Ces HDL petites et denses dysfonctionnelles sont ensuite catabolisées au niveau rénal (Figure 27) (Cardner et al. 2020; Chapman 2022).

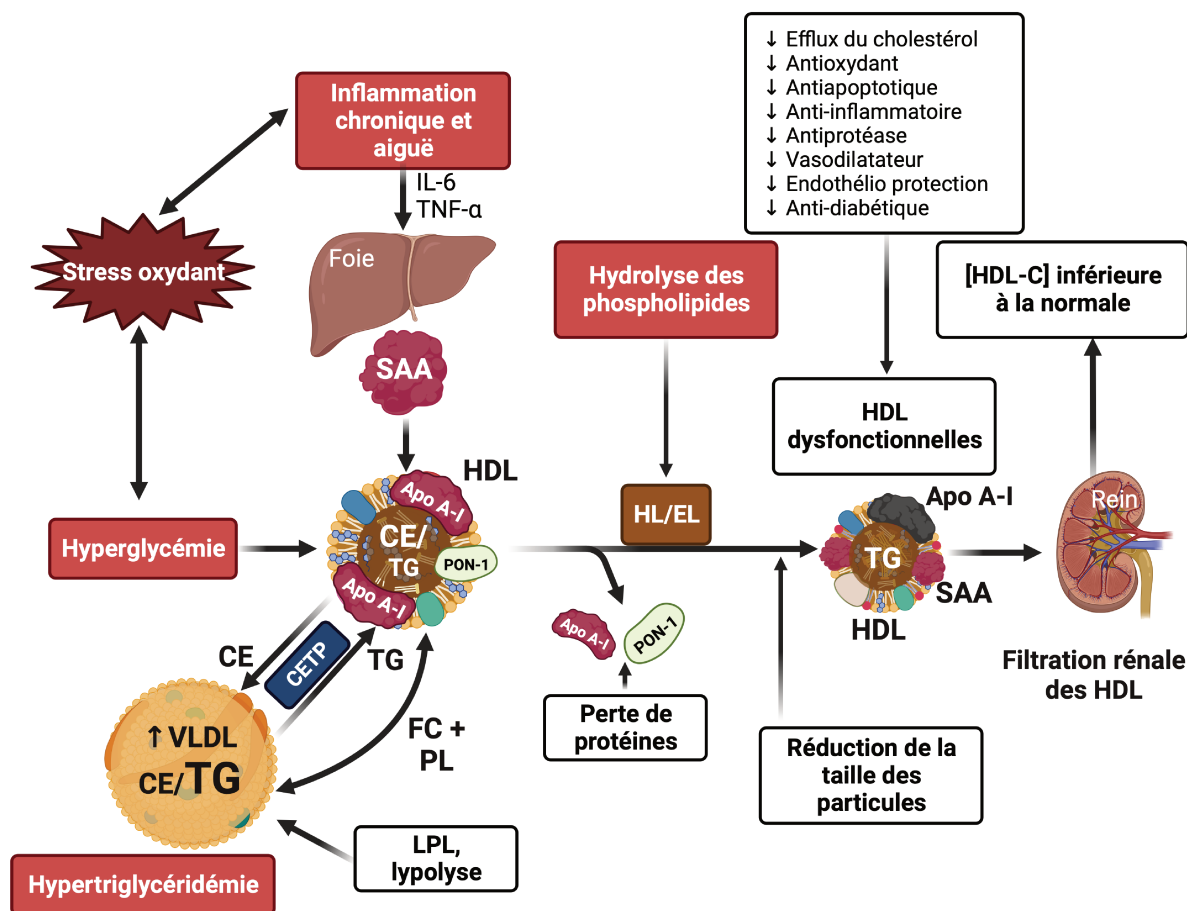
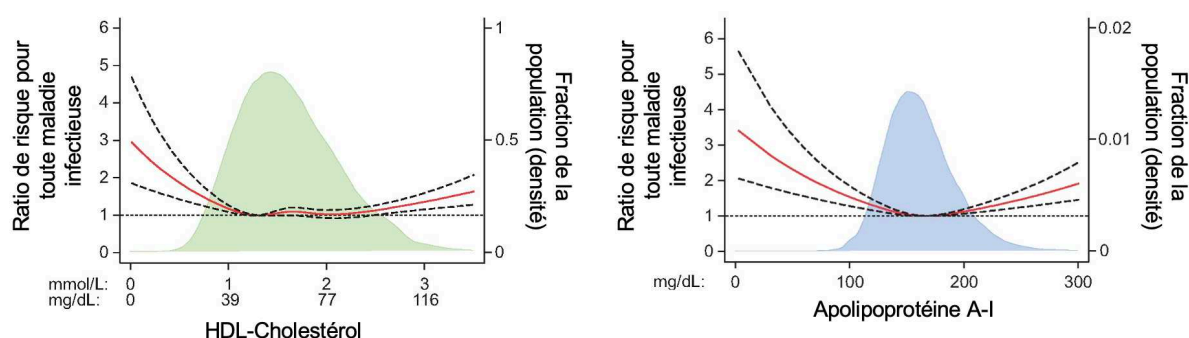


Figure 27. Métabolisme altéré des HDL au cours du diabète de type 2 avec une hyperglycémie, l'insulino-résistance, l'hypertriglycéridémie et un stress oxydant élevés conduisant à une inflammation systémique chronique (adaptée de (Chapman 2022)).

Les HDL sont la cible d'altération structurales et fonctionnelles en situation d'inflammation chronique de bas grade. Nous allons voir par la suite les modifications de ces nanoparticules dans le contexte d'une inflammation aiguë dans le modèle de sepsis bactérien.

### 3. Inflammation aiguë - dysfonction en situation de sepsis bactérien

Le sepsis se définit comme une dérégulation de la réponse inflammatoire de l'organisme à une infection (bactérienne, virale, fongique ou parasitaire) pouvant causer un dysfonctionnement des organes et par la suite la mort (Gyawali et al. 2019). De plus, la concentration en HDL-C est inversement corrélée à la mortalité et conduit à une dysfonction systémique (Van Leeuwen et al. 2003; Chien et al. 2005). La réponse à l'infection par une réaction d'inflammation aiguë se caractérise par une surproduction de médiateurs inflammatoires comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6), les phospholipases, les prostaglandines et les protéines de la phase aiguë (Chen et al. 2017). En parallèle de l'inflammation aiguë, le métabolisme lipidique est modifié pendant l'infection avec une modification des concentrations en lipides et en lipoprotéines. Parmi ces changements durant l'infection, les concentrations en triglycérides et du VLDL-cholestérol sont augmentées, tandis que les concentrations en cholestérol total, HDL-C et LDL-C sont diminuées (Chien et al. 2005; Wendel et al. 2007).



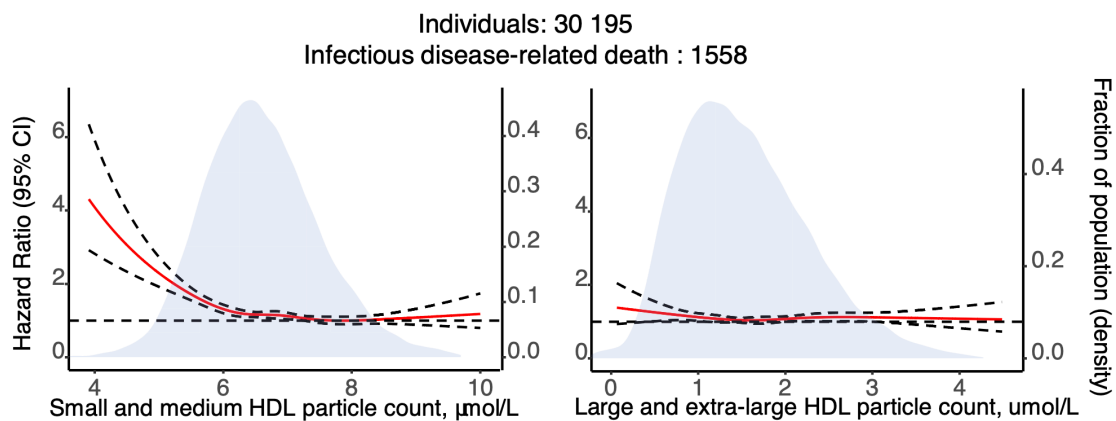
**Figure 28. Liens entre les concentrations en HDL-C, en Apo A-I et la mortalité associée aux maladies infectieuses en population générale (Étude Copenhague, adaptée de (Madsen et al. 2018))**

Cette concentration basse en HDL-C (<20 mg/dL) et en Apo A-I (<100 mg/dL), On peut la retrouver au premier jour d'un sepsis sévère, associée à un tableau clinique défavorable et à une mortalité importante (Figure 28) (Chien et al. 2005; Wendel et al. 2007). Paradoxalement, comme nous avons pu le voir avec les maladies cardiovasculaires, des concentrations extrêmement élevées en HDL-C et en Apo A-I peuvent être associées à un risque accru de mortalité au cours des maladies infectieuses (Figure 28) (Madsen et al. 2018). Ces observations montrent l'importance de cibler la qualité des HDL plutôt que leur quantité.

Les différentes variations quantitatives sont associées à une altération du métabolisme lipidique. Il existe un lien entre hypertriglycéridémie et des concentrations basses en HDL-C. Durant une infection bactérienne, la présence de LPS favorise la circulation

des lipoprotéines riches en triglycérides contribuant à l'hypertriglycéridémie (Feingold et al. 1992). De plus, la réduction de l'activité de la LPL induit aussi une diminution de la production de HDL-C (Feingold et al. 1994). Au cours d'un sepsis sévère, les concentrations en LCAT et CETP sont diminuées alors que les concentrations en EL et en PLTP sont augmentées avec pour conséquence une diminution des concentrations de HDL-C. D'ailleurs, l'activité de la LCAT est également diminuée chez ces patients (Reisinger et al. 2022). Ces modifications suggèrent que les HDL sont converties en HDL riches en triglycérides qui donnent rapidement des pré $\beta$ -HDL et de l'Apo A-I libre par action de l'EL (Maugeais et al. 2003; Nijstad et al. 2009). Ainsi, la taille de ces nanoparticules est également modifiée par l'infection. Dès leur arrivée en service de réanimation, les patients ayant un sepsis présentent une concentration faible en HDL-C avec une répartition particulière : plus de grosses particules de HDL et moins de petites HDL. La taille plus importante des HDL est possiblement associée à leur capacité à transporter le LPS pour son élimination (Figure 30) (de la Llera Moya et al. 2012; Tanaka et al. 2019).

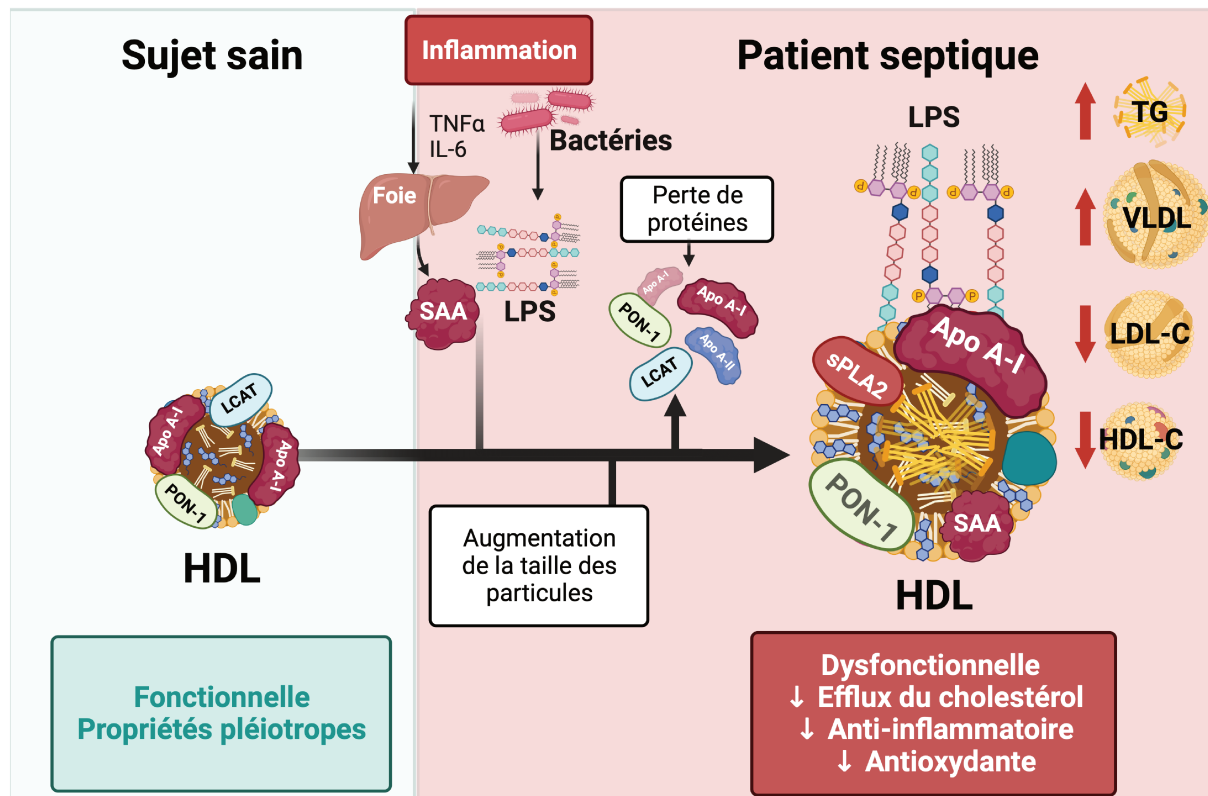
Une étude récente menée en population générale par Harsløf et al. et portant sur l'analyse des différentes sous-populations de HDL par RMN, a montré une association entre des concentrations basses en petites HDL, HDL intermédiaire et l'augmentation de la morbidité et de la mortalité chez les patients souffrant de maladies infectieuses (Figure 29) (Harsløf et al. 2023).



**Figure 29. Relation entre le nombre et la taille des particules de HDL en fonction de la mortalité associée aux maladies infectieuses (Harsløf et al. 2023).**

En plus de leur diminution quantitative et de la modification de leur taille, la composition et la fonctionnalité des HDL sont altérées suite à une infection. La composition protéique des HDL est effectivement fortement altérée au cours d'un sepsis. Cette altération s'illustre par une diminution en apolipoprotéine (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III et E), en complément C3 et aussi en enzymes clés pour leur fonctionnalité comme la LCAT, la CETP, PON, PAF-AH. Cette déplétion en certaines protéines s'accompagne d'un enrichissement en

d'autres notamment la SAA, l'Apo J et la PLA2 sécrétée (sPLA2) (Figure 30) (Feingold et al. 1998; Van Leeuwen et al. 2003; Draganov et al. 2010; de la Llera Moya et al. 2012; Sharma et al. 2017; Reisinger et al. 2022). L'enrichissement de la SAA dans les HDL se fait par le déplacement de l'Apo A-I (Cabana et al. 2004; Webb 2021). Les HDL deviennent dysfonctionnelles lorsqu'elles sont enrichies en SAA et elles deviennent pro-inflammatoires en stimulant la production de MCP-1 par interaction avec les récepteurs TLR2 et TLR4 (Schuchardt et al. 2019). Les HDL chez les patients septiques ont également perdu leur capacité à effectuer l'efflux du cholestérol tant par la voie ABCA1 que par celle de SR-B1 (de la Llera Moya et al. 2012). Les HDL s'enrichissent en triglycérides et s'appauvrissent en esters de cholestérol. La modulation des protéines composant les HDL conduit à une perte des fonctions antioxydantes et anti-inflammatoires de ces nanoparticules (Figure 30) (McGillicuddy et al. 2009; Sharma et al. 2019; Reisinger et al. 2020).



**Figure 30. Altération des HDL et du profil lipidique pendant un sepsis bactérien (adaptée de (Pirillo et al. 2015)).**

Nous avons pu voir que dans un contexte pathologique, les HDL sont fortement altérées tant quantitativement que qualitativement en raison de leur exposition à des médiateurs pro-oxydants ou pro-inflammatoires produits durant une inflammation chronique et ou lors d'une inflammation aiguë suite à une infection. Le renouvellement en HDL fonctionnelles par supplémentation est une solution thérapeutique envisageable pour lutter contre les pathologies inflammatoires.

### III. HDL mimétique à des fins thérapeutiques

Nous avons rappelé dans cette partie bibliographique que les concentrations de HDL-C étaient inversement corrélées à l'incidence des maladies cardiovasculaires (**Wilson et al. 1988**) et que des concentrations basses en HDL-C et en Apo A-I étaient associées à un risque accru de mortalité et de morbidité liées aux infections (**Madsen et al. 2018**). Ainsi, ces observations cliniques ont incité à définir l'augmentation des concentrations en HDL-C comme une approche thérapeutique d'intérêt. Divers médicaments ont été développés et testés dans de nombreux essais cliniques pour répondre à cet objectif. La présentation et la description de ces études cliniques associées à ces médicaments ont fait l'objet d'une revue dans le journal *Current Atherosclerosis Reports*. Dans la partie suivante, je développerai davantage les approches thérapeutiques utilisant des nanoparticules d'Apo A-I.

#### A. Les différentes HDL mimétiques

En raison des modifications à la fois quantitative et qualitative des HDL au cours de différentes pathologies, une nouvelle voie thérapeutique reposant sur l'injection de HDL mimétiques a été développée (**Tsompanidi et al. 2010; Cho 2022**). *Badimon et al.* ont été les premiers à montrer les effets bénéfiques de l'injection de HDL sur les plaques d'athérome dans un modèle *in vivo* (**Badimon et al. 1990**). L'infusion de HDL mimétiques présente de nombreux avantages avec toutefois quelques limites (**Tableau 6**) (**Kingwell and Chapman 2013**).

**Tableau 6. Avantages et limites des thérapies reposant sur l'infusion de HDL (traduit de (Kingwell and Chapman 2013)).**

Propriétés	Avantages	Limites
Pharmacocinétique	Augmentation du nombre de particule de HDL : élévation importante, rapide, proportionnelle à la dose et dépendante du temps de l'Apo A-I et génération rapide de niveaux élevés de pré-βHDL.	Demi-vie et durée d'action courtes de l'Apo A-I Absence d'augmentation du nombre de particules à l'équilibre
Voie d'administration intraveineuse	Convient à l'administration lors d'interventions vasculaires de courte durée	Administration à long terme n'a pas été réalisée à grande échelle Injections multiples nécessaires
Fonctionnalité de HDL	Efflux du cholestérol, absorption de glucose, vasodilatation et inhibition de l'inflammation, de l'adhésion et de la réactivité plaquettaire.	
Profil de sécurité	Bonne	
Facilité et coût de production	Les HDL reconstituées dérivées du plasma humain sont relativement peu coûteuses à produire	La production de HDL à partir d'Apo A-I recombinant et de peptides mimétiques de l'Apo A-I est plus complexe et plus coûteuse.

Les HDL mimétiques présentent une structure similaire aux préβ-HDL et sont constituées de phospholipides et d'Apo A-I sous forme de protéine totale (Murray et al. 2016). Les HDL produites à partir d'Apo A-I délipidée provenant de plasma sont appelées HDL reconstituées (rHDL), parmi elles, celles produites par le laboratoire CSL (Commonwealth Serum Laboratories) Behring (SRC-rHDL/CSL111 et CSL112) (Lerch et al. 1996; Tardif and Heinonen 2007; Tricoci et al. 2015). Les HDL mimétiques contenant la protéine totale d'Apo A-I produite dans un système d'expression recombinant bactérien, eucaryote sont appelées HDL recombinantes, comme les CER-001, ETC-216, MDCO-216 (Nicholls et al. 2011; Tardif et al. 2014; Kallend et al. 2016). Au-delà des HDL reconstituées ou recombinantes, de nombreuses études ont développé des peptides mimétiques de l'Apo A-I. Ces peptides d'Apo A-I présentent une taille de 18 à 22 peptides et peuvent ainsi être facilement synthétisés tout en présentant les mêmes propriétés bénéfiques que l'Apo A-I totale. Certains de ces peptides mimétiques sont complexés avec des phospholipides comme l'ETC-642 (Di Bartolo et al. 2011a, b) ou encore le 5A (Tabet et al. 2010; Amar et al. 2010). D'autres peptides mimétiques ne sont pas complexés aux phospholipides, comme les peptides 4F (Navab et al. 2006).

## 1. SRC-rHDL/CSL111

Les premières HDL reconstituées utilisées en essais cliniques ont été produites par ZLB Central Laboratoire, ce sont les **SRC-rHDL** (Swiss Red Cross rHDL). Les SRC-rHDL sont produites à partir d'Apo A-I précipitée du plasma puis reconstituées. Ces HDL reconstituées sont composées d'une molécule d'Apo A-I pour 150 molécules phosphatidylcholines de soja (**Lerch et al. 1996**). À l'origine, les SRC-rHDL devaient être utilisées dans le traitement du sepsis, étant donné la capacité des HDL à neutraliser les endotoxines (**Parker et al. 1995; Casas et al. 1995**). Cependant, en raison de ses propriétés endothélio-protectrices, le SRC-rHDL a été repositionné en médicament contre l'athérosclérose. En 2000, le SRC-rHDL devient le **CSL111** après le rachat de ZLB par CSL Limited (**Tardif and Heinonen 2007; Krause and Remaley 2013; Tardif et al. 2014**).

## 2. CSL112

Une nouvelle formule de CSL111 a été développée et nommée CSL112 afin de pallier l'hépatotoxicité du CSL111 (**Lerch et al. 1996; Diditchenko et al. 2013**). Ces CSL112 sont composées de deux molécules d'Apo A-I pour environ 110 molécules de phosphatidylcholine de soja et du sucrose comme agent stabilisant (**Diditchenko et al. 2013; Tricoci et al. 2015**). Les CSL112 ont montré une tolérance clinique à des doses plus importantes que celles utilisées pour les CSL111 (**Easton et al. 2014; Tricoci et al. 2015**). Ces CSL112 sont plus homogènes et présentent une taille unique (7,1-7,6 nm) de nanoparticules, plus petite que les HDL3, tandis que les CSL111 présentent deux tailles (12,6 et 17,7 nm) (**Lerch et al. 1996; Diditchenko et al. 2013**). Des études *in vitro* ont montré que les CSL112 amélioreraient l'efflux du cholestérol et qu'elles conserveraient cette capacité *in vivo* chez des sujets sains (**Diditchenko et al. 2013; Gille et al. 2014**). Aussi, le CSL112 a de nombreuses propriétés anti-inflammatoires et stabilise la plaque d'athérome *in vivo* et *in vitro* (**Ortega-Paz et al. 2023**).



### 3. CER-001

Les CER-001 sont des HDL recombinantes composées d'Apo A-I recombinante produite par des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO, *Chinese Hamster Ovary cells*) complexée à deux différents phospholipides, les sphingomyélines et le dipalmitoyl phosphoglycérol (Tardy et al. 2014). L'administration de CER-001 est tolérée en une seule dose de 45 mg/kg chez l'Homme, celui-ci mobilise et élimine le cholestérol par le transport inverse des lipides (Keyserling et al. 2017). Dans un modèle de souris déficientes en LDLR, l'administration de CER-001 a permis d'augmenter le transport inverse du cholestérol en réduisant la progression de la plaque d'athérosclérose. Parallèlement, des effets anti-inflammatoires ont été montrés avec une réduction de production de cytokines pro-inflammatoires (MCP-1, IL-6) et l'inhibition de l'adhésion monocytaire aux cellules endothéliales a été observée *in vitro* (Tardy et al. 2014).

### 4. ETC-216, MDCO-216

Une stratégie alternative à l'utilisation d'Apo A-I natif, a été de produire des mutants d'Apo A-I, notamment l'Apo A-I Milano. L'Apo A-I Milano a été identifiée dans un petit village d'Italie appelé Limone sul Garda chez 40 individus présentant des concentrations basses en HDL-C sans développer, pour autant, de maladies cardiovasculaires. La différence avec l'Apo A-1 natif réside dans la substitution d'une arginine en position 173 par une cystéine sur le gène de l'APOA1 chez le mutant Milano (Franceschini et al. 1980; Weisgraber et al. 1983). La complexation de l'Apo A-I Milano recombinante avec du dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) forme l'**ETC-216** qui présente des propriétés vasculo-protectrices (Shah et al. 1998; Nicholls et al. 2011).

Les résultats encourageants obtenus dans les études cliniques utilisant L'ETC-216 sont détaillés dans la prochaine partie. L'ETC-216 est devenue le **MDCO-216** par la Medicines Co., suite à une amélioration du processus de production des HDL mimétiques (Nicholls et al. 2011). Le MDCO-216 est composé d'Apo A-I Milano recombinant et de 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Kallend et al. 2016).

### 5. ETC-642

Une nouvelle stratégie de synthèse de HDL mimétiques est la lipidation de peptide mimétique de l'Apo A-I comme l'ETC-642 qui est constitué d'un peptide d'Apo A-I de 22 acides aminés complexé avec du DPPC et des sphingomyélines dans des ratios 1/1/1. L'ETC-642 a montré des effets anti-inflammatoires associés à une inhibition de la progression de l'athérosclérose *in vivo* chez des lapins atteints d'hyperlipidémie (Di Bartolo et al. 2011a, b; Iwata et al. 2011).



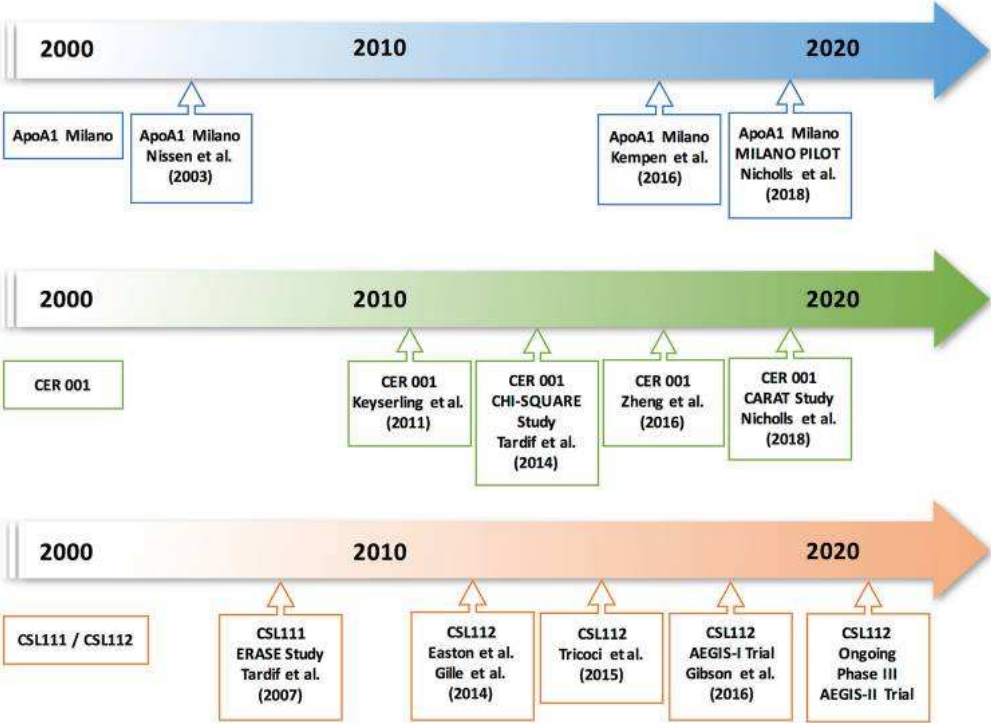
## B. Supplémentation en nanoparticules d'Apo A-I en situation de perturbation métabolique

De nombreuses études ont décrit l'efficacité des injections de HDL mimétiques en tant que médicament dans des modèles *in vitro* et *in vivo* en situation d'athérogénèse. L'ensemble des résultats montre un effet bénéfique de la supplémentation dans différents modèles impliquant globalement des effets anti-inflammatoires et athéroprotecteurs (**Tableau 7**) (**Murphy et al. 2009**).

**Tableau 7. Résumé des effets vasculo-protecteurs des HDL mimétiques *in vitro* et *in vivo* (adaptée de (Rani and Marsche 2023)).**

<b>HDL mimétiques</b>	<b><i>In vitro</i></b>	<b>Effets</b>
CSL111	Macrophage dérivé de monocyte humain	↑ Efflux du cholestérol, ↓ TLR2, NF-κB
ETC-642	THP-1-monocytes	↓ Adhésion monocytaire
ETC-642	Macrophage RAW264.7	↓ MCP-1, p65 sous-unité de NF-κB
PS-Apo A-I	THP-1 monocytes et macrophage de monocyte humain	↓ Ciblage de TLR4 par les radeaux lipidiques ↑ Efflux du cholestérol
Peptide 4F	Macrophage dérivé de monocyte humain	↓ Production de cytokines inflammatoires, radeaux lipidiques ↑ Efflux de cholestérol, polarisation M2
Peptide 4F	Monocyte humain	↓ NF-κB activation, phagocytose, marqueur inflammatoire de surface ↓ CD14, assemblage et recyclage de TLR4
Peptide 18A	THP-1 macrophage, HUVEC	↓ Adhésion et migration des monocytes ↓ Chimiotaxie
5A-POPC/5A-SM-DPPC	Macrophage RAW264.7	↑ Efflux du cholestérol, polarisation M2 ↓ Production de cytokine ↓ Sécrétion de MCP-1
<b>HDL mimétiques</b>	<b><i>In vivo</i></b>	<b>Effets</b>
Apo A-I Milano-PC	Souris déficiente en Apo E	↑ Efflux du cholestérol ↓ Macrophages dans la plaque
Apo A-I Milano	Lapin hypercholestérolémiques	↑ Efflux du cholestérol ↓ Épaisseur de l'intima, macrophages dans l'intima
CER-001	Souris déficiente LDLr	↑ Efflux du cholestérol ↓ Production de cytokines, MCP-1
CSL111	Modèle murin d'infarctus du myocarde	↑ Efflux du cholestérol ↓ CD11b sur les monocytes circulants
CSL112	Essai clinique	↑ Efflux du cholestérol ↓ Marqueurs instabilité de la plaque et cytokine anti-inflammatoire
Peptide 4F	Modèle de maladie cardiovasculaire murin dyslipidémique	↑ Estérification du cholestérol par la LCAT ↑ Efflux du cholestérol
5A-PLPC	Lapin avec la carotide fermée par un collier	↓ Réduction de la teneur en macrophages dans la lésion ↑ Efflux du cholestérol
5A-POPC/ 5A-SM-DPPC	Souris déficiente en Apo E	↓ Stress oxydant ↑ Efflux du cholestérol
5A peptide	Modèle murin de colite	↓ Développement de la plaque ↓ Infiltration monocytaire

Au vu des résultats précliniques prometteurs des injections de HDL mimétiques, différents essais cliniques ont été élaborés principalement sur les maladies cardiovasculaires, résumés dans le **Tableau 8 et Figure 31**.



**Figure 31. Chronologie des études humaines des thérapies de perfusion de HDL mimétiques (Kalayci et al. 2022).**

**Tableau 8. Liste des essais cliniques sur les infusions de HDL (adaptée de (Rani and Marsche 2023)).**

HDL mimétique	Protéine	Lipide	Administration	Nombre de patients	Essai clinique	Découvertes majeures	Raison de l'interruption de l'essai clinique
<b>ETC-216</b>	Apo A-I Milano recombinante	DPPC	Une dose hebdomadaire sur 5 semaines, par voie intraveineuse, 15 mg/kg et 45 mg/kg	57	Milano, Phase II	Diminution significative du volume de l'athérome	Changement de propriétaire de l'entreprise ; limitation de la production et de la qualité des protéines
<b>MDCO-216</b>	Apo A-I Milano recombinante	POPC	Une dose hebdomadaire sur 5 semaines, par voie intraveineuse, 20 mg/kg	126	MILANO-PILOT, Phase III, NCT02678923	Augmentation de de l'efflux de cholestérol, absence de régression de la plaque.	Changement de propriétaire de l'entreprise ; limitation de la production et de la qualité des protéines
<b>CER-001</b>	Apo A-I natif recombinante	SM, DPPG	Une dose hebdomadaire sur 6 semaines, par voie intraveineuse, 12 mg/kg	507	CHI SQUARE, Phase II NCT01201837	Pas de régression de l'athérosclérose coronarienne	Effets bénéfiques insuffisants dans la maladie coronarienne
<b>CER-001</b>	Apo A-I natif recombinante	SM, DPPG	Une dose hebdomadaire par voie intraveineuse de 3 mg/kg avec les statines sur 10 semaines	293	CARAT, Phase II NCT2484378	Pas de régression de l'athérosclérose coronarienne	Effets bénéfiques insuffisants dans la maladie coronarienne
<b>CSL111</b>	Apo A-I purifiée de plasma humain	PC de soja	Une dose hebdomadaire sur 4 semaines, par voie intraveineuse, 40 mg/kg et 80 mg/kg	111	ERASE, Phase II, NCT00225719	Amélioration significative de l'indice de caractérisation de la plaque, élévation des enzymes hépatiques dans le groupe 80 mg/kg.	Modifié et amélioré en CSL112
<b>CSL112</b>	Apo A-I purifiée de plasma humain	PC de soja	Une dose hebdomadaire sur 4 semaines, par voie intraveineuse, 2 g et 6 g	1258	AEGIS-I, Phase II, NCT02108262	Pas de toxicité rénale/hépatique, bien toléré	N.A
<b>CSL112</b>	Apo A-I purifiée de plasma humain	PC de soja	Une dose hebdomadaire sur 4 semaines, par voie intraveineuse, 6 g	17 400	AEGIS-II, Phase III, NCT03473223	Résultats attendus	N.A
<b>ETC-642</b>	Peptide mimétique de l' Apo A-I, 22 acides aminés, hélice simple	DPPC et SM	Une dose hebdomadaire sur 4 semaines, > 30 mg/kg	28	Phase I	Sûre et tolérée, activation de la LCAT	Changement de propriétaire de l'entreprise

Les premières HDL injectées à des humains ont été les **SRC-rHDL**, une HDL reconstituée avec une injection unique à une dose de 40 mg/kg chez des volontaires sains. Cette étude a montré que cette injection était bien tolérée par les sujets et qu'elle induisait la production de pré $\beta$ -HDL associée à une activation du transport inverse du cholestérol, ainsi que l'augmentation de la concentration d'Apo A-I, une modulation du métabolisme des lipoprotéines humaines (**Nanjee et al. 1999**). Les SRC-rHDL devenues les **CSL111** ont ensuite été testées au sein d'un essai clinique nommé ERASE (*The Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety and Efficacy*). Cette étude ERASE visait à évaluer l'effet des CSL111 sur l'évolution de la plaque d'athérome analysée par échographie intravasculaire. Ces CSL111 ont été administrées par une perfusion hebdomadaire pendant quatre semaines à une dose de 40 mg/kg chez 111 patients et 80 mg/kg chez 12 autres patients. Aucune des deux doses n'a montré de réductions significatives du volume de l'athérome. L'étude a ensuite été arrêtée en raison de l'élévation des enzymes hépatiques dans le groupe de patients à 80 mg/kg et de l'hypotension dans le groupe à 40 mg/kg (**Tardif 2007; Tardif and Heinonen 2007**). L'innocuité de la version améliorée des CSL111, les **CSL112**, a été vérifiée sur des sujets sains en simple ou en multiples doses. La particule CSL112 a été tolérée par les sujets sains chez qui il a été noté une augmentation de leur concentration en Apo A-I, une meilleure capacité à effectuer le transport inverse du cholestérol ainsi qu'une estérification accrue de leur cholestérol (**Easton et al. 2014**). L'étude AEGIS-1 randomisée, en double aveugle et multicentrique a été réalisée sur des patients présentant une athérosclérose stable ayant reçu une unique injection de CSL112. Trois doses ont été testées de 1,7 g, 3,8 g et de 6,8 g chez ces patients et celles-ci ont été bien tolérées. Les injections de CSL112 ont montré une augmentation des concentrations en Apo A-I plasmatique ainsi que de l'efflux du cholestérol (**Tricoci et al. 2015; Gibson et al. 2022**). Les mêmes observations ont été notées chez des patients en situation d'insuffisance rénale modérée suite à l'administration de CSL112 (**Gille et al. 2019**). *Gibson et al.* ont également confirmé la tolérance des CSL112 ainsi que leur impact durable sur l'efflux du cholestérol lorsque celles-ci étaient administrées sur une durée de 4 semaines à une dose hebdomadaire de 6g (**Gibson et al. 2022**). Actuellement, les CSL112 font l'objet d'une étude multicentrique de phase 3, en double aveugle, randomisée et contrôlée par un placebo (étude AEGIS-II) à laquelle participent près de 17 400 patients souffrant de maladies cardiovasculaires. L'objectif principal de l'étude est d'évaluer l'efficacité d'une perfusion hebdomadaire de 6 g de CSL112 sur une durée de 4 semaines sur la réduction d'évènements cardiovasculaires indésirables majeurs jusqu'à 90 jours (**Gibson et al. 2021**).

Les HDL recombinantes formulées à partir d'Apo A-I Milano, l'**ETC-216** ont également été évaluées au cours d'un essai clinique portant sur 123 patients souffrant de maladies cardiovasculaires. L'ETC-216 a été administrée par une perfusion hebdomadaire sur cinq semaines avec deux groupes de patients recevant des doses de 15 mg/kg ou de 45 mg/kg. L'injection de ces nanoparticules a permis de réduire significativement le volume de l'athérome, mesuré par une échographie intravasculaire, chez les patients traités à l'ETC-216 comparée au placebo (**Nissen et al. 2003**). La version améliorée de l'ETC-216, devenue le **MDCO-216**, a été évaluée au cours de l'étude MILANO-PILOT. Cette étude a été effectuée en double aveugle, randomisée, placebo-control, multicentrique. Les injections de MDCO-216 à une dose de 20mg/kg en complément des statines n'ont pas induit de régression de la plaque d'athérome chez ces patients (**Nicholls et al. 2018b**).

L'Apo A-I recombinante a été associée à deux type de phospholipides, des sphingomyélines et des dipalmitoylphosphoglycérols pour former le **CER-001** qui a montré des résultats prometteurs dans les modèles *in vivo* (**Tableau 7**) (**Tardy et al. 2014, 2015**). Le CER-001 a été évalué au cours de l'étude CHI-SQUARE (*The Can HDL Infusions Significantly Quicken Atherosclerosis Regression*). Dans cette étude à double aveugle, randomisée, contrôlée par placebo et à doses croissantes, 507 patients ont été recrutés et répartis en trois groupes pour recevoir chacun une dose différente de CER-001, 3 mg/kg, 6 mg/kg et 12 mg/kg, sous forme de six perfusions hebdomadaires. Dans cette étude, le CER-001 n'a pas démontré d'effets positifs sur la régression de l'athérosclérose chez ces patients (**Tardif et al. 2014**). Un nouvel essai clinique CARAT (*The CER-001 Atherosclerosis Regression Acute Coronary Syndrome Trial*) a été mené avec une dose unique de 3 mg/kg de CER-001 sur 10 semaines. Comme la précédente étude, aucun effet des CER-001 en complément des statines n'a été montré sur l'athérosclérose coronarienne (**Nicholls et al. 2018a**). La dose de CER-001 a été de nouveau évaluée au cours d'un essai clinique de Phase 1 et celui-ci a permis de montrer qu'une unique dose allant jusqu'à 45 mg/kg était tolérée par les sujets sains (**Keyserling et al. 2017**). Un nouvel essai clinique a donc été réalisé pour évaluer l'effet des CER-001 mais cette fois-ci chez des patients ayant des niveaux bas en HDL-C avec une impossibilité d'effectuer le transport inverse du cholestérol. Un traitement prolongé de 24 semaines au CER-001 à une dose de 8 mg/kg, n'a pas montré d'effet sur l'inflammation de la paroi artérielle et ceux malgré l'amélioration du RCT (**Zheng et al. 2020**).

Ainsi, dans l'attente des résultats du CSL112 (étude AEGIS-II) et au vu de l'absence d'effets significatifs des HDL la régression des plaques d'athérosclérose, les administrations de HDL ont été repositionnées dans d'autres pathologies notamment le sepsis en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires et anti-infectieuses.

### C. Perfusion de HDL mimétiques en situation d'inflammation aiguë au cours d'une infection

En situation de sepsis, les concentrations de HDL-C sont drastiquement diminuées et les particules de HDL deviennent dysfonctionnelles. *Trinder et al.* ont montré que l'augmentation pharmacologique des HDL-C par voies médicamenteuses permet de pallier cette diminution en HDL-C tout en améliorant le pronostic vital des souris en situation de sepsis (**Trinder et al. 2020, 2021**). Ainsi l'injection de HDL mimétique serait une nouvelle approche thérapeutique pour pallier ces altérations rencontrées lors d'une inflammation aiguë, d'autant plus que les HDL présentent des propriétés anti-inflammatoires et sont capables de se lier aux LPS pour les neutraliser (**Wurfel et al. 1994**). Certaines HDL mimétiques ont été évaluées dans des modèles précliniques mais assez peu chez l'Homme.

Les **CSL111** ont été testées dans des modèles précliniques de sepsis bactérien. Sur ces différents modèles précliniques, les injections de CSL111 ont réduit significativement la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6) ainsi que la concentration en LPS dans le plasma (**Casas et al. 1995; Hubsch et al. 1995**). Une étude sur différents modèles de sepsis de souris (pneumonie aiguë, péritonite, sepsis) a évalué l'effet des CSL111 sur les infections bactériennes. Les injections de CSL111 ont permis d'améliorer la survie des différents modèles de sepsis en réduisant simultanément les cytokines pro-inflammatoires et le nombre de bactéries dans les organes (**Tanaka et al. 2020a**). En 1996, la première étude humaine sur l'injection de rHDL chez l'homme a été réalisée par *Pajkrt et al.* qui ont injecté des endotoxines d'*Escherichia coli* à 8 sujets sains volontaires après avoir reçu une perfusion de SRC-rHDL/CSL111 à une dose de 40 mg/kg. Cette étude a montré que l'administration préalable CSL111 a permis d'inhiber la production de cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8), de réduire l'expression de CD14 sur les monocytes et également de limiter la leucopénie, la monocytopenie, et la neutropénie (**Pajkrt et al. 1996**).

Les HDL synthétiques en situation d'inflammation aiguë comme l'ETC-642 ont été peu évaluées dans des modèles précliniques et *in vitro*. Elles ont seulement été testées dans un modèle de souris sepsis. Leur administration par voie intraveineuse a permis de montrer une amélioration de la fonction rénale et une réduction de l'inflammation. *In vitro*, les ETC-642 ont également montré leur capacité à inhiber l'activation de NF-κB induit par le LPS et le LTA. De plus, l'ETC-642 est anti-inflammatoire et vasculo-protecteur lors de l'exposition aux endotoxines des cellules endothéliales (Guo et al. 2022) .

Une récente étude translationnelle de Stasi et al. a montré des effets bénéfiques des injections de **CER-001** chez des patients souffrant de sepsis et également sur un modèle *in vivo* de souris septiques. Cette étude montre que les injections en CER-001 présentent des effets pléiotropes chez les patients souffrant de sepsis et chez les souris septiques. Ces effets se traduisent par une diminution de la tempête cytokinique, une augmentation de l'excrétion de LPS dans la bile, la restauration des niveaux d'Apo A-I et par la réduction de la dysfonction endothéliale et rénale. Ainsi, le CER-001 devient un candidat potentiel pour une approche thérapeutique dans le traitement du sepsis (Stasi et al. 2023).





# **VALORISATION BIBLIOGRAPHIQUE**





# HDL as a Treatment Target: Should We Abandon This Idea?

Floran Begue<sup>1</sup> · Marie Laurine Apalama<sup>1</sup> · Gilles Lambert<sup>1</sup> · Olivier Meilhac<sup>1,2</sup>

Accepted: 19 November 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2023

## Abstract

**Purpose of Review** High-density lipoproteins (HDL) have long been regarded as an antiatherogenic lipoprotein species by virtue of their role in reverse cholesterol transport (RCT), as well as their established anti-inflammatory and antioxidant properties. For decades, HDL have been an extremely appealing therapeutic target to combat atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD).

**Recent Findings** Unfortunately, neither increasing HDL with drugs nor direct infusions of reconstituted HDL have convincingly proven to be positive strategies for cardiovascular health, raising the question of whether we should abandon the idea of considering HDL as a treatment target.

**Summary** The results of two large clinical trials, one testing the latest CETP inhibitor Obicetrapib and the other testing the infusion of patients post-acute coronary events with reconstituted HDL, are still awaited. If they prove negative, these trials will seal the fate of HDL as a direct therapeutic target. However, using HDL as a therapeutic agent still holds promise if we manage to optimize their beneficial properties for not only ASCVD but also outside the cardiovascular field.

**Keywords** HDL · Atherosclerosis · Cardiovascular disease · CETP inhibitor

## Introduction

Of all lipoproteins, high-density lipoproteins (HDL) are the smallest with a diameter ranging from 8 to 14 nm and the most protein enriched. Apolipoprotein A-I (Apo A-I) accounts for 70% of HDL protein mass [1]. HDL also contains a diverse proteome, consisting of other apolipoproteins (e.g., Apo A-II, Apo A-IV, Apo Cs, Apo E) and several enzymes such as lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) and paraoxonases (PON). Nascent HDL, also referred to as pre-beta-HDL, are discoidal in shape and contain Apo A-I, phospholipids, and non-esterified cholesterol. Mature HDL, referred to as alpha-HDL, are spherical in shape and also contain esterified cholesterol generated by LCAT as well as triglycerides in their core. The most investigated function of HDL is reverse cholesterol transport (RCT), a

metabolic pathway by which excess cholesterol is removed from peripheral tissues and transported to the liver. This is permitted by the selective uptake of HDL-cholesterol esters by hepatocytes, a process mediated by the scavenger receptor-B1 (SR-B1). In addition, HDL display antioxidant and anti-inflammatory properties. Taken together, these characteristics are thought to confer HDL particles' cardiovascular protective properties [2, 3].

Indeed, countless epidemiological studies have established that circulating HDL-cholesterol (HDL-C) concentrations negatively correlate with the incidence of cardiovascular diseases, the leading cause of death worldwide [4, 5]. Paradoxically, the association between HDL and cardiovascular and all-cause mortality is U shaped, with individuals with extremely high HDL-C levels being at increased risk. The mechanisms underlying this observation are unknown. It has nevertheless been proposed that HDL particles in these individuals were dysfunctional [6]. For years, increasing HDL-C levels has been an extremely appealing therapeutic strategy to prevent and cure atherosclerotic cardiovascular diseases (ASCVD). Thus, circulating HDL and Apo A-I levels can be starkly increased by a healthy lifestyle consisting of a balanced diet and physical exercise [7–10]. However, pharmacological modalities aimed at increasing HDL, in particular the cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitors, have

---

Floran Begue and Marie Laurine Apalama contributed equally to this work.

---

✉ Gilles Lambert  
gilles.lambert@univ-reunion.fr

<sup>1</sup> Inserm, UMR 1188 Diabète Athéromatose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROÏ), Université de La Réunion, 97410 Saint-Pierre, France

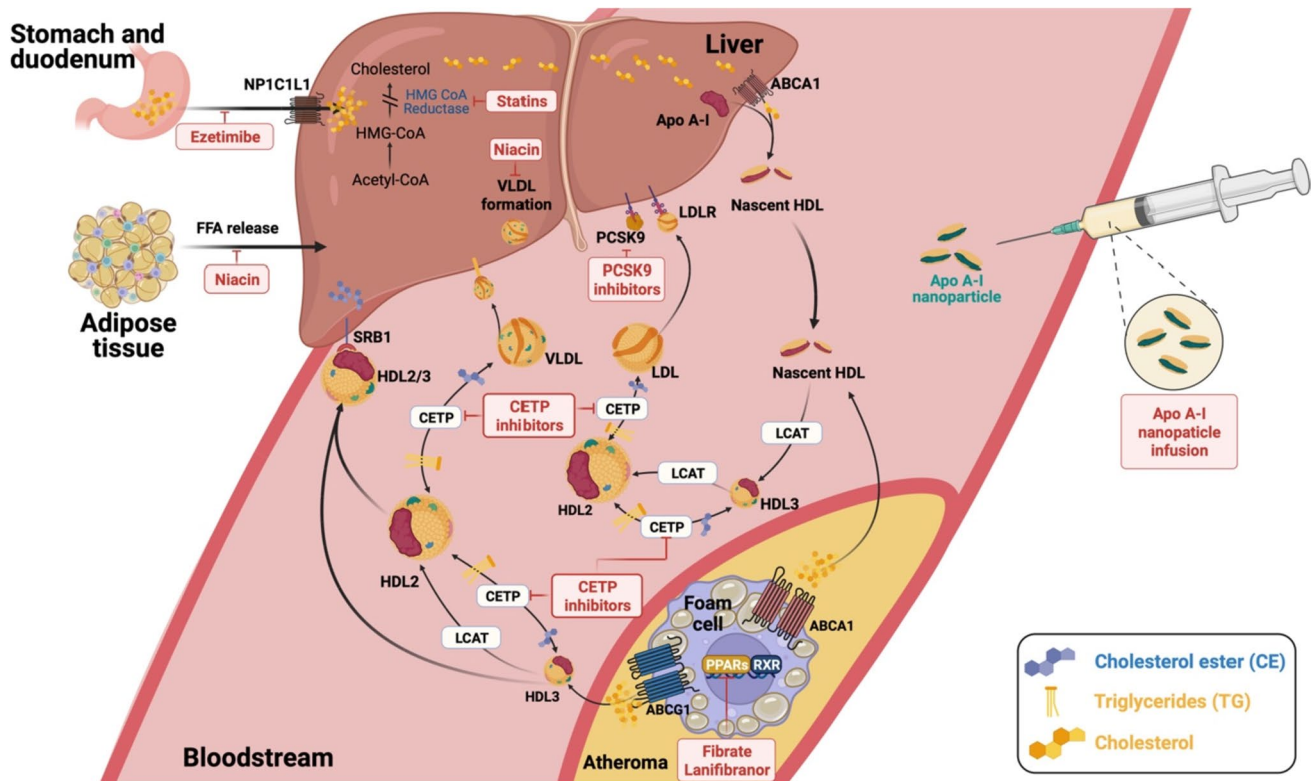
<sup>2</sup> CHU de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France

failed to provide incremental cardiovascular benefits. Likewise, direct infusions of reconstituted HDL have also yielded poor results. In that respect, recent Mendelian randomization studies do not appear to support a protective role for HDL in cardiovascular health, raising the question of whether we should abandon the idea of considering HDL as a treatment target once and for all [11, 12].

## Reverse Cholesterol Transport: the Basis for Research into Drugs Targeting HDL

HDL targeting as a therapy stems (i) from the observation that HDL-C levels are inversely correlated with cardiovascular mortality and (ii) from HDL's pivotal role in RCT [13, 14]. RCT is a multi-step pathway (Fig. 1) proposed to facilitate the clearance of cholesterol that has accumulated within atherosclerotic plaques. The first step is mediated by the ATP-binding cassette A1 (ABCA1), a transporter expressed in many cell types, allowing the efflux of phospholipids and cholesterol molecules present in plasma membranes and their association with circulating

Apo A-I originating from hepatocytes or enterocytes [15, 16], thereby generating nascent HDL particles. The second step consists of cholesterol esterification by LCAT, an enzyme secreted from the liver and activated by apoA-I [17]. Unlike cholesterol and phospholipids molecules, cholesterol esters are entirely hydrophobic and subsequently migrate into the core of nascent HDL, thus generating spherical particles. ABCA1 as well as the ATP-binding cassette G1 (ABCG1) transporter continue to efflux cellular lipids to mature HDL [15, 18]. In parallel, HDL undergo a series of remodeling steps under the combined action of enzymes (LCAT, endothelial, and hepatic lipases) and transfer proteins (phospholipid transfer protein, CETP), the latter being responsible for the equimolar exchanges of cholesterol esters and triglycerides molecules between HDL and other classes of lipoproteins [2, 19]. The final step of RCT is the selective uptake of HDL-cholesterol esters, a process mediated by the scavenger receptor SR-B1 [20]. Whole HDL particles endocytosis occurs via a complex mechanism that involves the ecto-F1-ATPase and the P2Y13 receptor [21]. In humans, most of the cholesterol present in HDL is esterified and transferred by CETP to an



**Fig. 1 HDL metabolism and pharmacotherapeutic targets.** ABCA1: ATP-binding cassette A1; ABCG1: ATP-binding cassette G1; Apo A-I: apolipoprotein A-I; CETP: cholesterol ester transfer protein; FFA: free-fatty acid; HDL: high-density lipoproteins; HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; PCSK9: proprotein

convertase subtilisin/kexin type 9; PPARs: peroxisome proliferator-activated receptor; LCAT: lecithin cholesterol acyltransferase; LDL: low-density lipoproteins; LDLR: LDL receptor; NP1C1L1: Niemann–Pick C1-like 1; RXR: retinoid x receptors; SR-B1: scavenger receptor B1; VLDL: very-low-density lipoproteins

apolipoprotein B containing lipoprotein, in particular very-low-density lipoproteins (VLDL), and therefore ends up in intermediate-density and then low-density lipoproteins (LDL) that are cleared by the LDL receptor (LDLR) [22]. This is not the case in most other animal species, in particular rodents, that naturally lack CETP. Noteworthy, gene expression of many RCT players is governed by nuclear receptors such as peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and the liver X receptor (LXR), but increasing HDL levels and activating RCT using selective agonists of these transcription factors have proven disappointing in terms of cardiovascular benefits [23, 24].

Mouse models have been widely developed to investigate RCT and to assess the athero-protective function of HDL (Table 1). For instance, Apo A-I and LCAT knockout (KO) mice have virtually no HDL in their plasma, but whereas, Apo A-I KO [25] are prone to developing atherosclerotic plaques, LCAT-KO are not [26]. Likewise, SR-B1 KO mice that accumulate HDL do not display less atherosclerotic lesions than wild-type animals [27, 28]. In contrast, mice that overexpress human CETP display more atherosclerotic plaques than controls [29, 30]. Conflicting observations have, however, been reported. These discrepancies likely result from the use of mice with different genetic backgrounds, different diets (high-fat vs. atherogenic diets), or distinct procedures to assess atherosclerosis (*en face* aortas vs. aortic sinus) between studies, making it difficult to draw definitive conclusions regarding the pro- or antiatherogenic roles of each protein implicated in RCT.

## Increasing HDL Pharmacologically: a Disappointing Journey

### Niacin and Fibrates

Several drugs safely reduce low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and associated cardiovascular risk by either inhibiting endogenous cholesterol synthesis

(statins), reducing cholesterol intestinal absorption (ezetimibe), or increasing the abundance of the LDL receptor (PCSK9 inhibitors). Even if these drugs marginally increase HDL-C plasma levels, their beneficial effects have only been causally linked to their ability to reduce LDL [31–36].

In contrast, drugs aimed at reducing plasma triglycerides (TG) such as niacin and fibrates can substantially increase the circulating levels of HDL-C. Niacin (also known as nicotinic acid or vitamin B3) [37] that showed encouraging results in pilot studies was tested in two large outcome trials: AIM-HIGH (Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome with Low HDL/High triglycerides: Impact on Global Health Outcomes) and HPS2-THRIVE (Heart Protection Study 2-Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events). AIM-HIGH compared niacin to placebo on top of high-dose simvastatin in patients with established cardiovascular disease. Niacin improved their lipid profile with a combined increase in HDL-C (+25%) and reductions in TG (−28%) and LDL-C (−12%), but the trial was stopped after a mean follow-up period of three years owing to lack of clinical efficacy [38]. Likewise, HSP2-THRIVE compared the efficacy of niacin (plus laropiprant) to placebo on top of statin therapy in more than 25,000 patients at very high cardiovascular risk. As in AIM-HIGH, niacin increased HDL and lowered both TG and LDL-C levels but failed to significantly reduce the risk of major vascular events [39].

Agonists of the PPAR alpha nuclear receptor, known as fibrates, primarily function by reducing hepatic triglyceride synthesis and enhancing lipolysis. As a result, they lower circulating TG and increase HDL [40]. In the VA-HIT trial (Veterans Affairs Cooperative Studies Program High-Density Lipoproteins Cholesterol Intervention Trial), gemfibrozil significantly reduced the major risk of cardiovascular events in secondary prevention [41]. In the BIP (Bezafibrate Infarction Prevention) study, bezafibrate increased in HDL-C (+18%) and reduced TG (−21%) but failed to significantly reduce coronary events in secondary prevention. However, bezafibrate significantly reduced cardiovascular events in two subgroups of patients: those with baseline TG levels above 200 mg/dL [42] and those with metabolic syndrome [43]. Likewise, in the FIELD (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes) study, fenofibrate did not significantly reduce coronary events in this primary prevention trial exclusively conducted in diabetics. This lack of efficacy was attributed to a higher prescription rate of statins to patients randomized to placebo in this study [44]. Fenofibrate was therefore assessed on top of simvastatin in the ACCORD (Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes) trial in type 2 diabetic patients. Again, fenofibrate did not provide any significant cardiovascular benefit compared with placebo [45].

**Table 1** Mouse models of HDL metabolism and effect on atherosclerosis

Target	Effect on target	Model	Effect
Apo A-I	Targeted gene deletion	Mouse	↓↓ HDL ↑↑ Atherosclerosis
LCAT	Targeted gene deletion	Mouse	↓↓ HDL ↑↓ Atherosclerosis
SR-B1	Targeted gene deletion	Mouse	↑↑ HDL ↑↑ Atherosclerosis
CETP	Human cDNA overexpression	Mouse	↓↓ HDL ↑↑ Atherosclerosis

↑ and ↓ respectively denote increases and decreases

*Apo A-I*, apolipoprotein A-I; *CETP*, cholesterol ester transfer protein; *LCAT*, lecithin cholesterol acyltransferase; *SR-B1*, scavenger receptor B1

Likewise, the more recent PROMINENT (Pemafibrate to Reduce Cardiovascular Outcomes by Reducing Triglycerides in Patients with Diabetes) trial testing pemafibrate on top of statins failed to demonstrate any significant cardiovascular benefit despite improvements in patients' lipid profiles [46]. Lastly, the pan-PPAR agonist Lanifibranor currently tested in the NATIVE (NASH Trial to Validate IVA337 Efficacy) trial showed positive changes in lipid profile; in particular, it increases HDL-C levels [47]. This study has, however, specifically been designed to study nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and not cardiovascular outcomes.

### CETP Inhibitors

Like LDL-lowering therapies such as statins, neither niacin nor fibrates were designed to specifically increase HDL concentrations. Given the overall disappointing results of both drugs in clinical trials, LDL-lowering strategies using statins, but also ezetimibe and nowadays Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibitors, remain to this day at the center of CVD prevention and treatment [48]. It has long been envisaged that a drug able to specifically increase HDL and hence RCT would nicely complement LDL-lowering approaches to further reduce CVD risk. The molecular target of choice of such a drug was CETP, given that this protein transfers cholesterol from HDL to apo B containing lipoproteins [49]. The interest in CETP as a therapeutic target was fueled by the discovery of Japanese families with a loss of function genetic variant in the *CETP* gene, associated with sharply increased HDL-C concentrations. Despite a net increase in plasma total cholesterol, these individuals did not appear at increased CVD risk [50].

The ILLUMINATE (Investigation of Lipid Level Management to Understand Its Impact in Atherosclerotic Events) study was the first large-scale cardiovascular outcome trial with a CETP inhibitor. The aim of that study was to assess the efficacy of the CETP inhibitor Torcetrapib on the risk of major cardiovascular events in 15,000 patients at high cardiovascular risk and treated with atorvastatin doses sufficient to achieve LDL-C levels of less than 100mg/dL [51]. To the surprise of many, despite promoting a massive 72% increase in HDL-C levels and a 25% decrease in LDL-C, Torcetrapib significantly increased the number of cardiac events and deaths, prompting the premature termination of the trial. This negative result was later shown to result from off-target effects of Torcetrapib, that is, a concomitant increase in blood pressure among treated individuals [51]. Several other CETP inhibitors have been developed, and a handful were evaluated in clinical trials. Dalcetrapib, for instance, was tested in 15,900 patients with recent acute coronary syndrome on top of statins. Dalcetrapib increased HDL-C by 30 to 40% with minimal effects on LDL-C. Despite these

changes, Dalcetrapib failed to significantly reduce the risk of cardiovascular events [52]. The more potent Anacetrapib was tested in the DEFINE (Details of the Determining the Efficacy and Tolerability of CETP Inhibition with Anacetrapib) and REVEAL (Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid Modification) trials. The DEFINE study was designed to determine the safety and efficacy of Anacetrapib in patients with coronary heart disease or risk factors for cardiovascular disease. Anacetrapib showed positive improvements in their lipid profiles with an increase of 138% in HDL-C and a decrease of 40% in LDL-C [53]. In REVEAL, Anacetrapib was tested on top of statins in more than 30,000 patients in secondary prevention. It increased HDL-C levels by 104% and reduced LDL-C levels by 41%, and most importantly, it showed a significant reduction in the incidence of major coronary events over 4 years [54]. Anacetrapib development was nevertheless abandoned as the result of safety concerns since it was shown that the drug accumulates in the adipose tissue. The last CETP inhibitor evaluated in a large trial was Evacetrapib. As with all the others, it was tested as an adjunct to statin therapy in patients with cardiovascular diseases. Evacetrapib significantly increased HDL-C levels by 133% and lowered LDL-C by 31% but failed to reduce outcomes since primary endpoint events occurred in 12.9% of patients in the evacetrapib arm and in 12.8% of those in the placebo arm of that trial [55]. In a nutshell, the development of CETP inhibitors has been discontinued either because of toxicity or inefficacy. However, the development of this class of drugs is not dead yet, since a novel molecule, Obicetrapib, with promising effects (it reduced LDL-C by 46% and increased HDL-C by 165% in a phase II trial) recently entered a phase III outcome trial to assess its efficacy in cardiovascular disease [56••].

To put it mildly, despite the apparent positive effects of these drugs on human lipoprotein profiles, pharmacological strategies aimed at increasing HDL-C have failed to provide any significant clinical benefit. In HDL defense, their biology is probably much more complex than what was anticipated, but the recurrent disappointing results of HDL-increasing drugs cast serious doubts on the physiological reality of HDL's beneficial properties, not to mention their reliability as a treatment target in humans. The possibility of directly using HDL as an injectable pharmacological agent has therefore been proposed.

### HDL Infusion

An appealing pharmacological avenue developed in recent years has been to determine whether the direct infusion of HDL would be therapeutically beneficial. This can be achieved by infusing reconstituted HDL (rHDL) either in their native form or, most interestingly, with enhanced



beneficial features, such as improved RCT, anti-inflammatory, and antioxidant properties. An alternative strategy is to use delipidated human HDL plasma fractions that were shown to display potent cholesterol efflux properties on macrophages [57]. Delipidated HDL infusions significantly reduced coronary plaque burden in a handful of patients with ASCVD [58], but this method requires large volumes of blood and therefore appears difficult to develop. Another possibility is to infuse ApoA-I mimetics. These are short peptides mimicking the presumed beneficial effects of ApoA-I and HDL. Numerous studies have shown extremely promising results with these compounds in vitro and animal models, and some ApoA-I mimetics have even reached early clinical development (reviewed in detail in [59•]).

Several studies have reported that administering HDL isolated from plasma or reconstituted reduces atherosclerosis in animal models [60]. This led to the design of clinical studies to test rHDL infusions in patients at high cardiovascular risk. Many studies have used Apo A-I Milano rather than wild-type Apo A-I, given that carriers of this rare variant (Arginine-173 is replaced by a Cysteine) appear protected from ASCVD despite low levels of HDL-C. In pilot clinical trials, repeated infusions of rHDL over a few weeks reduced the atherosclerotic plaque burden assessed by intravascular ultrasound imaging. But, trials conducted in larger groups of patients for longer periods of time often failed to confirm these initial observations on hard cardiovascular outcomes [59•, 61–63••]. These studies include rHDL containing either recombinant human wild-type (CER-001) or Milano (ETC-216) Apo A-I as well as rHDL containing Apo A-I isolated from human subjects (CSL-111). The latter compound showed hepatotoxicity [64] and was therefore replaced by a new formulation, CSL-112, without this side effect. CSL-112 is currently being tested in a large phase III study (AEGIS-II, <https://clinicaltrials.gov/identifier/NCT03473223>). This will be the first large-scale trial to formally evaluate whether enhancing cholesterol efflux in humans can reduce the rate of recurrent major adverse cardiovascular events [65]. Even if the results of this study prove positive, supplementation with reconstituted HDL will only be aimed at a narrow population of patients (e.g., post-acute coronary syndromes), considering that they must be infused intravenously.

## Conclusion and Perspectives

The HDL-targeted therapies developed so far have consisted of either increasing HDL-C plasma levels with small molecules (such as CETP inhibitors) or infusing reconstituted HDL (or analogs such as mimetic peptides) into patients with ASCVD. To say the least, these approaches have not produced conclusive results yet in demonstrating that increasing HDL reduces

the progression of the disease nor associated cardiovascular outcomes. The results of two large clinical trials, one testing the latest CETP inhibitor Obicetrapib [66•] and the other testing the infusion of subjects post-acute coronary events with reconstituted HDL [65], are still awaited. If these studies prove negative, they will probably seal the fate of HDL as a therapeutic target for CVD.

Nevertheless, several avenues to enhance the beneficial functions of rHDL particles for future trials still exist. They consist not only (i) in using protective Apo A-I variants such as Apo A-I Milano but also (ii) in enhancing the lipid composition of these particles and (iii) in enriching rHDL particles with antioxidants, proteins, or micro-RNAs with established anti-atherosclerotic functionalities. Furthermore, “enhanced” rHDL particles could be specifically designed (iv) to treat non-cardiovascular medical conditions such as low-grade endotoxemia or even acute inflammation during sepsis since HDL possess lipopolysaccharide clearance properties [67, 68]. Given that the current route for rHDL delivery is intravenous, it severely limits their widespread use, not to mention their relatively short half-life in blood that necessitates repeated injections. (v) Both parameters should also be optimized in parallel. Thus, there is still room for improving rHDL function and delivery modalities as well as widening our views on their clinical potential outside the cardiovascular field. Using rHDL as a therapeutic agent should therefore not be abandoned.

**Funding** FB is the recipient of a PhD fellowship awarded by the *Région Réunion* and funded by the European Union (Brussels, Belgium). MLA is the laureate of a PhD scholarship awarded by the *Université de La Réunion* and funded by the Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France).

## Declarations

**Conflict of Interest** The authors declare no competing interests.

**Human and Animal Rights and Informed Consent** This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

## References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
  - Of major importance
1. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984;25:1277–94.
  2. Rye K-A, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barter PJ. The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res.* 2009;50:S195–200.



3. Wu Y, Xu Y, Chen J, Zhao M, Rye K-A. HDL and endothelial function. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1377:27–47.
4. Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP. High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis.* 1988;8:737–41.
5. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The global burden of cardiovascular diseases and risk. *J Am Coll Cardiol.* 2022;80:2361–71.
6. Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG. Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *Eur Heart J.* 2017;38:2478–86.
7. Khera AV, Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, et al. Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and coronary disease. *N Engl J Med.* 2016;375:2349–58.
8. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the management of blood cholesterol: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2019;139:e1046–81.
9. Muscella A, Stefàno E, Marsigliante S. The effects of exercise training on lipid metabolism and coronary heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020;319:H76–88.
10. Santos HO, Lavie CJ. Weight loss and its influence on high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) concentrations: a noble clinical hesitation. *Clin Nutr ESPEN.* 2021;42:90–2.
11. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a Mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012;380:572–80.
12. Tan Y-D, Xiao P, Guda C. In-depth Mendelian randomization analysis of causal factors for coronary artery disease. *Sci Rep.* 2020;10:9208.
13. Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J. Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1966;7:639–48.
14. Rader DJ, Hovingh GK. HDL and cardiovascular disease. *Lancet.* 2014;384:618–25.
15. Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem.* 2001;276:23742–7.
16. Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, Wang N, Mzhavia N, Langlois R, et al. ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest.* 2008;118:3701–13.
17. Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta-Mol Cell Biol Lipids.* 2000;1529:245–56.
18. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117:2216–24.
19. Settasatian N, Duong M, Curtiss LK, Ehnholm C, Jauhiainen M, Huuskonen J, et al. The mechanism of the remodeling of high density lipoproteins by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem.* 2001;276:26898–905.
20. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996;271:518–20.
21. Martinez LO, Najib S, Perret B, Cabou C, Lichtenstein L. Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2015;238:89–100.
22. Tall A. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res.* 1993;34:1255–74.
23. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* 2001;7:161–71.
24. Li AC, Glass CK. PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2004;45:2161–73.
25. Plump AS, Azrolan N, Odaka H, Wu L, Jiang X, Tall A, et al. ApoA-I knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-I up-regulation in heterozygotes. *J Lipid Res.* 1997;38:1033–47.
26. Lambert G, Sakai N, Vaisman BL, Neufeld EB, Marteyn B, Chan CC, et al. Analysis of glomerulosclerosis and atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001;276:15090–8.
27. Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:12610–5.
28. Trigatti B, Rayburn H, Viñals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci.* 1999;96:9322–7.
29. Marotti KR, Castle CK, Boyle TP, Lin AH, Murray RW, Melchior GW. Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature.* 1993;364:73–5.
30. Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Zhang Y, Rothblat G, Rader DJ. Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport. *Circulation.* 2007;116:1267–73.
31. Mabuchi H, Haba T, Tatami R, Miyamoto S, Sakai Y, Wakasugi T, et al. Effects of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase on serum lipoproteins and ubiquinone-10 levels in patients with familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med.* 1981;305:478–82.
32. Robinson JG, Farnier M, Bergeron J, Luc G, Averna M, et al. Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015;372:1489–99.
33. Sabatine MS, Giugliano RP, Wiviott SD, Raal FJ, Blom DJ, Robinson J, et al. Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2015;372:1500–9.
34. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. Ezetimibe added to statin therapy after acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2015;372:2387–97.
35. Newman CB, Preiss D, Tobert JA, Jacobson TA, Page RL, Goldstein LB, et al. Statin safety and associated adverse events: a scientific statement from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39:e38–81.
36. Nissen SE, Lincoff AM, Brennan D, Ray KK, Mason D, Kastelein JJP, et al. Bempedoic acid and cardiovascular outcomes in statin-intolerant patients. *N Engl J Med.* 2023;388:1353–64.
37. Altschul R, Hoffer A, Stephen JD. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. *Arch Biochem Biophys.* 1955;54:558–9.
38. The AIM-HIGH Investigators. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med.* 2011;365:2255–67.
39. The HPS2-THRIVE Collaborative Group, Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, et al. Effects of Extended-Release Niacin with Laropiprant in High-Risk Patients. *N Engl J Med.* 2014;371:203–12.
40. Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, et al. Helsinki heart study: primary-prevention trial with

- Gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. *N Engl J Med.* 1987;317:1237–45.
41. Rubins HB, Rubins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, et al. Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *N Engl J Med.* 1999;341:410–8.
  42. The BIP Study Group. Secondary prevention by raising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102:21–7.
  43. Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ, Tanne D, Boyko V, Behar S. Bezafibrate for the secondary prevention of myocardial infarction in patients with metabolic syndrome. *Arch Intern Med.* 2005;165:1154–60.
  44. The FIELD study. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366:1849–61.
  45. The ACCORD Study Group. Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2010;362:1563–74.
  46. Das Pradhan A, Glynn RJ, Fruchart J-C, MacFadyen JG, Zaharris ES, Everrett BM, et al. Triglyceride lowering with pemafibrate to reduce cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2022;387:1923–34.
  47. Francque SM, Bedossa P, Ratziu V, Anstee QM, Bugianesi E, Sanyal AJ, et al. A randomized, controlled trial of the Pan-PPAR agonist lanifibranor in NASH. *N Engl J Med.* 2021;385:1547–58.
  48. Silverman MG, Ference BA, Im K, Wiviott SD, Giugliano RP, Grundy SM, et al. Association between lowering LDL-C and cardiovascular risk reduction among different therapeutic interventions: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2016;316:1289–97.
  49. Barter PJ, Hopkins GJ, Calvert GD. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem J.* 1982;208:1–7.
  50. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl-ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med.* 1990;323:1234–8.
  51. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJP, Komajda M, et al. Effects of Torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;357:2109–22.
  52. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012;367:2089–99.
  53. Cannon CP, Shah S, Danksy HM, Davidson M, Brinton EA, Gotto AM, et al. Safety of anacetrapib in patients with or at high risk for coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2010;363:2406–15.
  54. The HPS3/TIMI55-REVEAL collaborative Group, Bowman L, Hopewell JC, Chen F, Wallendszus K, Stevens W, et al. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377:1217–27.
  55. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesenmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, et al. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. *N Engl J Med.* 2017;376:1933–42.
  - 56.●● Nicholls SJ, Ditmarsch M, Kastelein JJ, Rigby SP, Kling D, Curcio DL, et al. Lipid lowering effects of the CETP inhibitor obicetrapib in combination with high-intensity statins: a randomized phase 2 trial. *Nat Med.* 2022;28:1672–8. **This phase 2 trial demonstrates the safety and efficacy of obicetrapib on top of statins in lowering atherogenic lipoproteins and apoB and increasing HDL and ApoA1, paving the way for a phase 3 trial to assess the potential clinical benefits of this novel CETP inhibitor.**
  57. Sacks FM, Rudel LL, Conner A, Akeefe H, Kostner G, Baki T, et al. Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. *J Lipid Res.* 2009;50:894–907.
  58. Waksman R, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Suddath WO, Satler LF, et al. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2727–35.
  - 59.● Wolska A, Reimund M, Sviridov DO, Amar MJ, Remaley AT. Apolipoprotein mimetic peptides: potential new therapies for cardiovascular diseases. *Cells.* 2021;10:597. **An excellent and comprehensive review on the potential of apolipoproteins mimetic peptides in cardiovascular health and beyond.**
  60. Di Bartolo BA, Cartland SP, Genner S, Manueedhi Cholan P, Vellozzi M, Rye K-A, et al. HDL improves cholesterol and glucose homeostasis and reduces atherosclerosis in diabetes-associated atherosclerosis. *J Diabetes Res.* 2021;2021:e6668506.
  61. Tardif J-C, Ballantyne CM, Barter P, Dasseux J-L, Fayad ZA, Guertin M-C, et al. Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur Heart J.* 2014;35:3277–86.
  62. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003;290:2292–300.
  - 63.●● Nicholls SJ, Andrews J, Kastelein JJP, Merkely B, Nissen SE, Ray KK, et al. Effect of Serial infusions of CER-001, a Pre- $\beta$  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 Cardiol.* 2018;3:815. **This clinical trial shows that infusions of reconstituted HDL do not promote regression of coronary atherosclerosis in statin-treated patients with ACS and high plaque burden.**
  64. Tardif J-C, Grégoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lespérance J, Heinonen TM, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;297:1675–82.
  65. Lee JJ, Chi G, Fitzgerald C, Kazmi SHA, Kalayci A, Korjian S, et al. Cholesterol efflux capacity and its association with adverse cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:774418.
  - 66.● Nelson AJ, Sniderman AD, Ditmarsch M, Dicklin MR, Nicholls SJ, Davidson MH, et al. Cholesteryl ester transfer protein inhibition reduces major adverse cardiovascular events by lowering apolipoprotein B levels. *Int J Mol Sci.* 2022;23:9417. **A solid demonstration that the potential cardiovascular benefits of CETP inhibitors are caused by the reduction in atherogenic lipoproteins rather than an elevation in HDL concentrations.**
  67. Tanaka S, Begue F, Veeren B, Tran-Dinh A, Robert T, Tashk P, et al. First recombinant high-density lipoprotein particles administration in a severe ICU COVID-19 patient, a multi-omics exploratory investigation. *Biomedicines.* 2022;10:754.
  68. Tanaka S, Couret D, Tran-Dinh A, Duranteau J, Montravers P, Schwendeman A, et al. High-density lipoproteins during sepsis: from bench to bedside. *Crit Care.* 2020;24:134.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



# **OBJECTIFS DE LA THÈSE**



Comme développé précédemment dans ma synthèse bibliographique, les propriétés bénéfiques des HDL ne peuvent se résumer au simple transport du cholestérol des tissus périphériques au foie pour son élimination.

En plus de cette fonction, les nanoparticules présentent des propriétés pléiotropes de type anti-inflammatoire, antioxydant et anti-infectieux. Le cholestérol contenu dans ces HDL est utilisé comme biomarqueurs de l'incidence des maladies cardiovasculaires (HDL-C), et aussi comme facteur de risque de sévérité lors d'un sepsis. En effet, les concentrations en HDL-C sont diminuées au cours des pathologies inflammatoires chroniques (comme le diabète) et aiguë (comme le sepsis). Au cours de ces pathologies, ces HDL sont aussi la cible d'altération structurale marquée par une altération de leurs tailles et leurs compositions en protéines et en lipides. Ces HDL altérées perdent alors leurs fonctions pléiotropes et peuvent même devenir pro-inflammatoires.

Parmi les pathologies à inflammation aiguë, nous avons décrit le cas du sepsis qui peut avoir une origine d'infection bactérienne mais il y a également celle provenant des infections virales comme celle du virus SARS-CoV-2. L'émergence de ce virus en décembre 2019 a donné lieu à la pandémie de la COVID-19 qui a abouti à une crise sanitaire mondiale. Cette maladie est marquée par un orage cytokinique, selon des mécanismes similaires au sepsis bactérien. Mais, elle se caractérise également par une altération du profil lipidique qui se traduit par une diminution des concentrations en cholestérol total, LDL-C, HDL-C et une élévation des TG. Au-delà des aspects quantitatifs, les modifications de la composition et de la fonctionnalité des lipoprotéines au cours de la COVID-19 restaient inconnue et aucun marqueur pronostique de la sévérité de cette maladie n'avait été identifié.

En raison de l'urgence sanitaire en 2021, le développement d'outils pronostiques de la COVID-19 et le développement d'une thérapie innovante contre cette pathologie était une priorité absolue.

Ce sont ces priorités qui ont défini, **l'objectif principal de ma thèse qui a été de caractériser les HDL en situation d'inflammation aiguë (COVID-19) afin d'identifier des biomarqueurs et d'évaluer une thérapie reposant sur une supplémentation en HDL mimétiques au cours de la COVID-19.**

Pour répondre à cet objectif, mes travaux de recherches se sont tout d'abord focalisés sur l'étude des modifications de l'apolipoprotéome plasmatique chez les patients COVID-19. Dans la seconde partie de mon travail, je me suis intéressé plus spécifiquement aux modifications du protéome des lipoprotéines HDL et LDL, afin d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs de sévérité de la COVID-19. Enfin, dans la troisième partie de mon travail, j'ai pu évaluer l'efficacité d'une thérapie utilisant l'injection de CER-001, HDL mimétiques reconstituées à partir d'Apo A-I recombinant, chez une patiente souffrant d'une COVID-19 sévère.





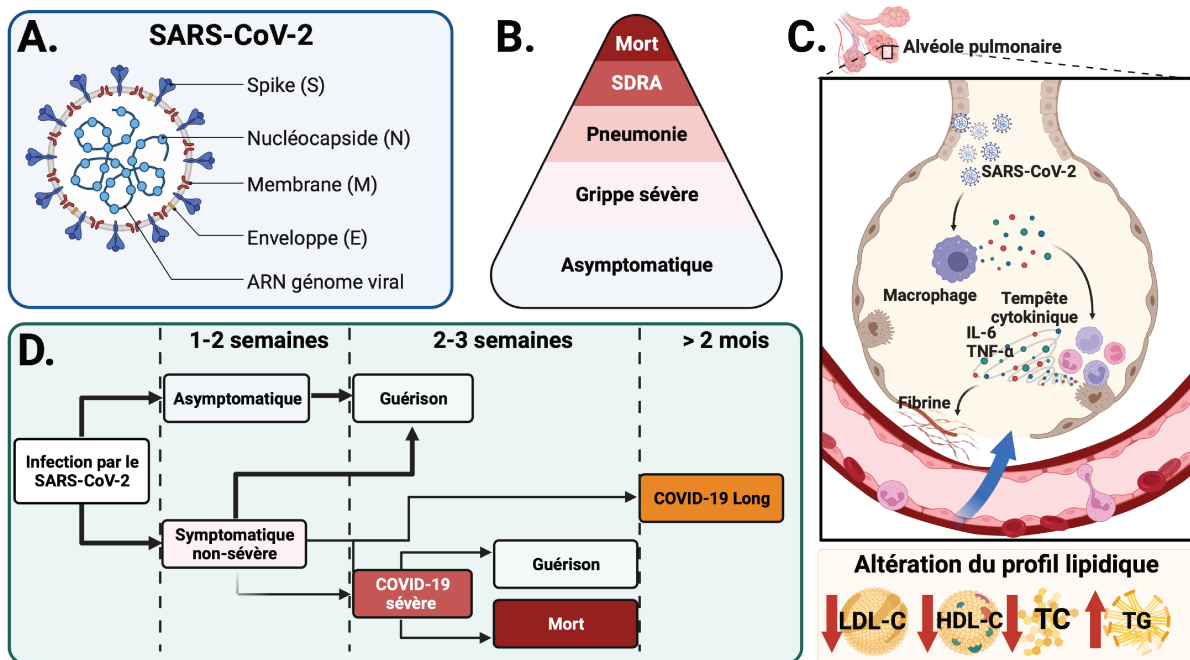


# **TRAVAUX DE RECHERCHE**



**PARTIE I. ALTÉRATION DE  
L'APOLIPOPROTÉOME DES  
PATIENTS EN RÉANIMATION POUR  
LEUR COVID-19**

## A. Introduction et objectifs



**Figure 32. SARS-CoV-2 : de la structure aux complications (inspirée de (Wang et al. 2020; Hu et al. 2021; Layne et al. 2022; Kostka et al. 2023)).**

La pandémie de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), a commencé à Wuhan, en Chine, en décembre 2019. Elle est due à une infection par le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Cette pandémie a touché plus de 770 millions de personnes et a causé plus de 6,9 millions de morts dans le monde (Zhu et al. 2020; Li et al. 2020). La COVID-19 présente un large spectre de signes cliniques, allant de simples troubles grippaux bénins voire asymptomatiques à une grippe sévère, pouvant entraîner une pneumonie, une défaillance systémique, un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et la mort (Figure 32 B et D.) (Huang et al. 2020a; Zhang et al. 2020).

Le virus SARS-CoV-2 consiste en un virus à ARN simple brin, enveloppé, dont le génome fait environ 30 kb. Son génome code pour des protéines de structure : une protéine de surface (la *spike* (S)), une protéine de membrane (M), une protéine d'enveloppe (E) et une nucléocapside (N) (Figure 32 A.). Le virus interagit avec les cellules hôte grâce à la liaison de la protéine spike (S) avec le récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) (Zhou et al. 2020; Hoffmann et al. 2020). Après être entré dans les cellules épithéliales pulmonaires, le SARS-CoV-2 provoque une réponse immunitaire. Puis, s'ensuit une infiltration de macrophages et de neutrophiles dans le tissu pulmonaire provoquant « une tempête cytokinique ». Elle se caractérise par des niveaux élevés en IL-6, TNF- $\alpha$ , en protéine chimiotactique monocyte-3 (MCP-3), interleukine-1 (IL-1) et en interféron  $\alpha/\beta$  (Yang et al. 2020; Vaninov 2020; Hu et al. 2021). Outre la « tempête cytokinique », une dyslipidémie se

met en place au cours de la COVID-19. Cette dyslipidémie se caractérise par des concentrations en cholestérol total, LDL-C et HDL-C drastiquement diminuées et par des concentrations élevées en triglycérides. Ces concentrations en cholestérol sont inversement corrélées à la sévérité de la COVID-19 (**Figure 32 C.**)(**Wei et al. 2020; Fan et al. 2020; Hu et al. 2020**). Cette altération du profil lipidique atteste d'un désordre du métabolisme lipidique qui peut être associé à une altération des concentrations en apolipoprotéines circulantes (**Dominiczak and Caslake 2011**).

Nous avons pu voir tout au long de la synthèse bibliographique, qu'au-delà de leur fonction dans le métabolisme des lipoprotéines, certaines de ces apolipoprotéines exercent des activités anti-inflammatoires et antioxydantes. À notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'impact de la COVID-19 sur les concentrations en apolipoprotéines autres que les apolipoprotéines majoritaires : l'Apo A-I et l'Apo B100.

Dans cette première étude, je me suis focalisé à déterminer l'impact de la COVID-19 sous sa forme sévère sur l'apolipoprotéome plasmatique et ainsi évaluer les relations putatives pouvant exister entre les concentrations plasmatiques en apolipoprotéines, les facteurs de gravité et le devenir des patients.

Afin de répondre à cet objectif, j'ai eu à ma disposition des plasmas de patients COVID-19 sévère proviennent de l'étude LIPICOR « LIPId profile changes in INflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2 » (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT05113836). Cette étude monocentrique a été initiée par notre laboratoire (Dr Sébastien Tanaka) et menée dans le service de réanimation chirurgicale de l'hôpital universitaire Bichat Claude-Bernard, Paris, France. Les patients ont été recrutés entre novembre 2020 à mars 2021.

Les 44 sujets contrôles utilisés dans cette première étude sont des volontaires sains et des soignants du Centre Hospitalier Universitaire de La Réunion (étude H-COV-RUN, ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT04384705). Cette étude a été initiée par notre laboratoire et menée par le Pr David Couret.

Nous avons sélectionné 44 patients sur les 76 patients de l'étude LIPICOR, selon un critère d'inclusion qui excluait les patients sous traitement hypolipémiant. Les sujets contrôles ont été appariés par sexe à ces patients COVID-19 sévère.

Dans cette étude, j'ai quantifié l'apolipoprotéome plasmatique de ces patients et des sujets sains. Notre méthode de quantification de l'apolipoprotéome a permis de quantifier 14 apolipoprotéines (Apo (a), Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo B100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, Apo E, Apo H, Apo J, Apo L1 and Apo M) ainsi que la LCAT. Cette quantification était ciblée via une méthode de surveillance des réactions parallèles (PRM) programmée dans le temps par spectrométrie de masse. Cette méthode a été adaptée et développée au laboratoire par le Dr Valentin Blanchard (**Blanchard et al. 2020**).

## **B. Résultats**

L'ensemble des résultats de cette première étude a fait l'objet d'un article intitulé « **Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID-19 Patients : Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study** » publié en 2023 dans le journal *International Journal of Molecular Sciences*.







# Article 1

International Journal of Molecular Sciences. 2023. DOI: 10.3390/ijms24054605

## **Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID- 19 Patients: Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study**

**Floran BEGUE**, Kévin CHEMELLO, Bryan VEEREN, Brice LORTAT-JACOB, Alexy TRAN-DINH, Nathalie ZAPPELLA, Aurelie SNAUWAERT, Tiphaine ROBERT, Philippe RONDEAU, Marie LAGRANGE-XÉLOT, Philippe MONTRAVERS, David COURET, Sébastien TANAKA and Olivier MEILHAC.





Article

# Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID-19 Patients: Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study

Floran Begue<sup>1</sup>, Kévin Chemello<sup>1</sup>, Bryan Veeren<sup>1</sup> , Brice Lortat-Jacob<sup>2</sup> , Alexy Tran-Dinh<sup>2,3,4</sup>, Nathalie Zappella<sup>2</sup>, Aurelie Snauwaert<sup>2</sup>, Tiphaine Robert<sup>5</sup>, Philippe Rondeau<sup>1</sup> , Marie Lagrange-Xelot<sup>6</sup>, Philippe Montravers<sup>2,3,7</sup> , David Couret<sup>1,6</sup> , Sébastien Tanaka<sup>1,2,†</sup> and Olivier Meilhac<sup>1,6,\*,†</sup>

- <sup>1</sup> INSERM, UMR 1188 Diabète Athéromatose Réunion Océan Indien (DéTROi), Université de La Réunion, 97410 Saint-Pierre de La Réunion, France
  - <sup>2</sup> Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Assistance, Bichat-Claude Bernard Hospital, 75018 Paris, France
  - <sup>3</sup> UFR Denis Diderot, University of Paris, 75015 Paris, France
  - <sup>4</sup> Laboratory for Vascular Translational Science, French Institute of Health and Medical Research (INSERM) U1148, 75018 Paris, France
  - <sup>5</sup> Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (AP-HP), Biochemistry Department, Bichat-Claude Bernard Hospital, 75018 Paris, France
  - <sup>6</sup> CHU de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France
  - <sup>7</sup> French Institute of Health and Medical Research (INSERM) U1152, Physiopathology and Epidemiology of Respiratory Diseases, 75018 Paris, France
- \* Correspondence: [olivier.meilhac@inserm.fr](mailto:olivier.meilhac@inserm.fr)  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Begue, F.; Chemello, K.; Veeren, B.; Lortat-Jacob, B.; Tran-Dinh, A.; Zappella, N.; Snauwaert, A.; Robert, T.; Rondeau, P.; Lagrange-Xelot, M.; et al. Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID-19 Patients: Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4605. <https://doi.org/10.3390/ijms24054605>

Academic Editor: Frances T. Yen

Received: 26 January 2023

Revised: 20 February 2023

Accepted: 22 February 2023

Published: 27 February 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/>).

**Abstract:** SARS-CoV-2 infection goes beyond acute pneumonia, as it also impacts lipid metabolism. Decreased HDL-C and LDL-C levels have been reported in patients with COVID-19. The lipid profile is a less robust biochemical marker than apolipoproteins, components of lipoproteins. However, the association of apolipoprotein levels during COVID-19 is not well described and understood. The objective of our study is to measure plasma levels of 14 apolipoproteins in patients with COVID-19 and to evaluate the relationships between apolipoprotein levels, severity factors and patient outcomes. From November to March 2021, 44 patients were recruited on admission to the intensive care unit because of COVID-19. Fourteen apolipoproteins and LCAT were measured by LC-MS/MS in plasma of 44 COVID-19 patients on admission to the ICU and 44 healthy control subjects. Absolute apolipoprotein concentrations were compared between COVID-19 patients and controls. Plasma apolipoproteins (Apo) A (I, II, IV), C(I, II), D, H, J and M and LCAT were lower in COVID-19 patients, whereas Apo E was higher. COVID-19 severity factors such as PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio, SO-FA score and CRP were correlated with certain apolipoproteins. Lower Apo B100 and LCAT levels were observed in non-survivors of COVID-19 versus survivors. To conclude, in this study, lipid and apolipoprotein profiles are altered in COVID-19 patients. Low Apo B100 and LCAT levels may be predictive of non-survival in COVID-19 patients.

**Keywords:** COVID-19; HDL-C; LDL-C; apolipoprotein; mass spectrometry; outcome; ICU; infection

## 1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19), which is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was first detected in December 2019 and has caused more than 5 million deaths worldwide [1,2]. The pathophysiology of this disease remains complex and is not fully understood. Until now, there are no reliable markers to predict the severity of COVID-19 [3]. In addition, the therapeutic arsenal, in particular for the

most severe patients, is thin and essentially based on corticosteroids, and more recently for certain patients only on nirmatrelvir/ritonavir [4,5].

Apolipoproteins (Apo) are proteins that associate with lipids and in particular phospholipids to form lipoproteins, responsible for the transport of hydrophobic lipids in the blood (triglycerides, cholesterol and cholesterol esters) [6]. Beyond their structural function of lipid transport via their recognition by cellular receptors, apolipoproteins have numerous functions (enzyme cofactors, anti-inflammatory, antioxidant and anti-infectious properties). In addition to the major apolipoproteins (A, B, C and E), others are described as being associated with lipoproteins, with functions different from those of lipid transport (i.e., D, J, L, F, H, M, N and O) [7,8]. Some apolipoproteins have been widely described, particularly in the context of cardiovascular diseases, as they are part of the composition of high-density lipoproteins (HDL) (Apo A1, Apo C-I, II, III and Apo E) and low-density lipoproteins (LDL) (Apo B100, Apo C-II, C-III and Apo E) [9,10].

During acute inflammatory states, and in particular during sepsis, a decrease in HDL-cholesterol (HDL-C) and LDL-cholesterol (LDL-C) concentrations has been clearly described, but also a decrease in apolipoproteins A-I (Apo A-I) and B (Apo B) [11–15]. Several studies have highlighted the relationship between decreased HDL-C/Apo A-I concentrations and poor outcome during sepsis [12,14,16]. Given that HDLs have pleiotropic effects, including anti-infectious, anti-inflammatory, antioxidant and overall endothelioprotective properties, the study of changes in the HDL proteome is therefore particularly relevant during sepsis [17].

In COVID-19 patients, some authors have underlined a negative correlation between both HDL-C and LDL-C concentrations and the severity of the disease [18–25]. Moreover, plasma Apo A-I concentration is drastically decreased in COVID-19 patients, and low levels are also associated with overmortality [26–29]. Interestingly, proteomic and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy studies have also revealed important structural and compositional changes in HDL particles resulting in a major pro-inflammatory phenotype [30–33].

While the association between Apo A-I and patient outcome is fairly well described in COVID-19, there is little evidence regarding the plasma concentration of other apolipoproteins and their relation to outcome.

In this context, the goals of the present study are (i) to determine plasma apolipoprotein concentrations in severe intensive care unit (ICU) COVID-19 patients and to compare these values with control subjects; and (ii) to evaluate the relationship between plasma apolipoprotein concentrations, severity factors and outcome.

## 2. Results

### 2.1. Study Population

From November 2020 to March 2021, a total of 76 COVID-19 patients were consecutively hospitalized for COVID-19 pneumonia in the ICU. Patients on statin therapy or for whom all clinical data could not be collected ( $n = 32$ ) were excluded, leading to the inclusion of 44 patients in our analysis. COVID-19 patients were matched by gender to 44 healthy volunteers who were obtained from caregivers at the Centre Hospitalier Universitaire de la Réunion. The general characteristics of COVID-19 patients and controls are summarized in Table 1. Age and BMI were significantly higher in COVID-19 patients than in the control group.

### 2.2. Lipid Parameters of COVID-19 Patients at Admission Compared to Control

Compared to control subjects, the lipid profile of COVID-19 patients was significantly altered and characterized by decreased total cholesterol (TC), HDL-C and LDL-C and increased TG concentrations (Figure 1). Of note, TC (3.7 [3.0–4.4] mmol/L,  $p < 0.0001$ ), HDL-C (0.8 [0.6–1.0] mmol/L,  $p < 0.0001$ ) and LDL-C (2.3 [1.6–2.8] mmol/L,  $p < 0.0001$ ) concentrations in COVID-19 patients were below the reference values, whereas TG levels

(1.8 [1.3–2.3] mmol/L,  $p < 0.0001$ ) in COVID-19 patients were above the reference values (cf. Section 4).

**Table 1.** General characteristics and outcome of ICU COVID-19 patients and control subjects.

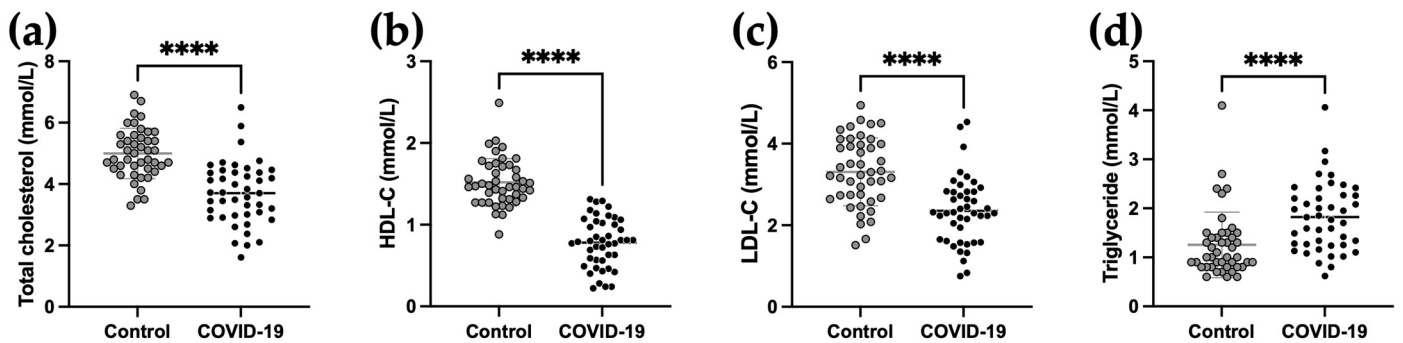
Characteristics	ICU COVID-19 ( <i>n</i> = 44)	Controls ( <i>n</i> = 44)	<i>p</i> -Value
Age, years, median (IQR)	62 (51–68)	50 (45–57)	<0.0001
Male sex, <i>n</i> (%)	33 (75)	33 (75)	>0.9999
BMI, kg/m <sup>2</sup> , median (IQR)	30 (27–32)	23 (26–32)	<0.0001
<b>Presence of comorbidities</b>			
High blood pressure, <i>n</i> (%)	17 (39)	0 (0)	<0.0001
Diabetes mellitus, <i>n</i> (%)	6 (14)	0 (0)	<0.0001
<b>Medications</b>			
Statin, <i>n</i> (%)	0 (0)		
ARA- II, <i>n</i> (%)	8 (18)		
<b>Timing of hospitalization</b>			
Between first symptoms and hospitalization (days)	6 (4–8)		
Between hospitalization and ICU admission (days)	0 (0–2)		
<b>Severity scores at admission</b>			
SAPS-II, median (IQR)	34 (26–46)		
SOFA score, median (IQR)	4 (3–4)		
<b>Treatments during ICU stay</b>			
Norepinephrine, <i>n</i> (%)	5 (11)		
Mechanical ventilation, <i>n</i> (%)	13 (30)		
Length of mechanical ventilation, median (IQR)	23 (17–32)		
Days alive without MV at day 28, median (IQR)	28 (8–28)		
Prone positioning, <i>n</i> (%)	10 (23)		
Tracheostomy, <i>n</i> (%)	3 (7)		
ECMO, <i>n</i> (%)	2 (5)		
RRT, <i>n</i> (%)	3 (7)		
<b>COVID-19-specific treatments</b>			
Tocilizumab, <i>n</i> (%)	3 (7)		
Remdesivir, <i>n</i> (%)	1 (2.5)		
Corticosteroids, <i>n</i> (%)	44 (100)		
<b>Outcome</b>			
ICU LOS (days), median (IQR)	7 (5–18)		
Hospital LOS (days), median (IQR)	11 (7–25)		
Mortality at day-28, <i>n</i> (%)	10 (23)		

ARA-II: angiotensin II receptor antagonist; ECMO: extracorporeal membrane oxygenation; ICU: intensive care unit; LOS: length of stay; RRT: renal replacement therapy; SAPS-II: simplified acute physiology score-II; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment.

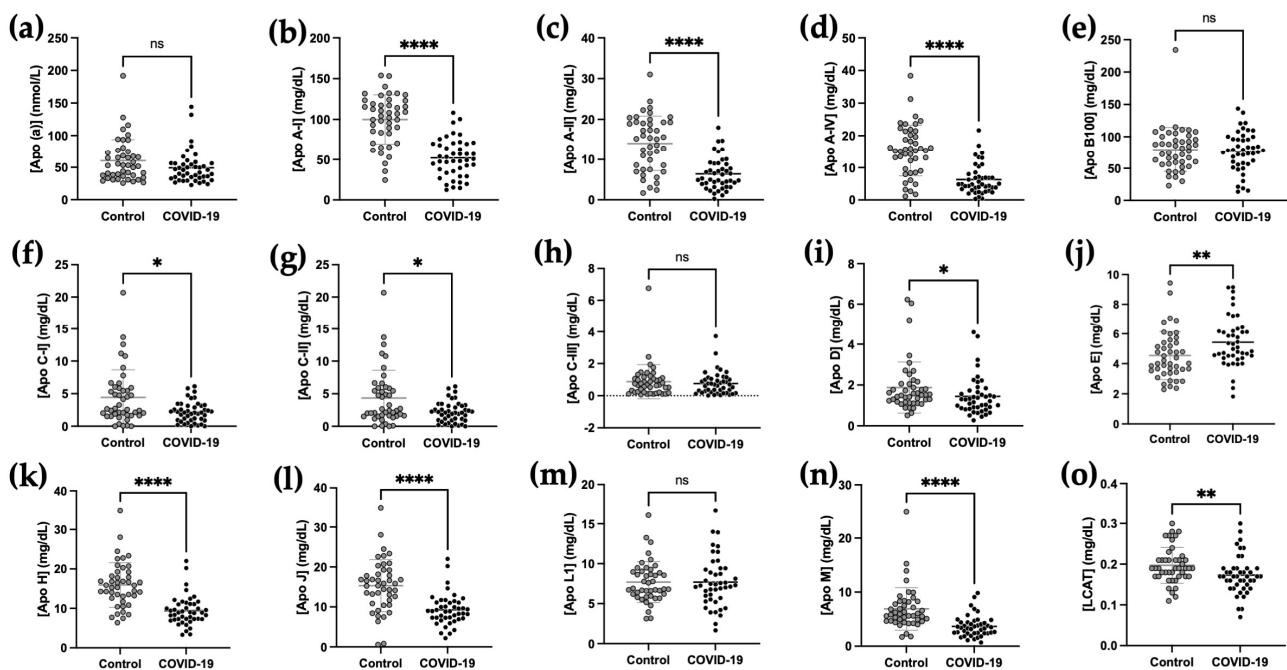
### 2.3. Comparison of Plasma Apolipoprotein Concentrations between COVID-19 and Control Subjects

While it is well documented that HDL-cholesterol and apolipoprotein A-I levels are decreased in severe COVID-19 patients, the concentration of other plasma apolipoproteins is poorly described. Apolipoproteins are multifunctional proteins involved in the structure of lipoproteins and in lipid metabolism [34]. Given that the lipid profile is profoundly affected in COVID-19, we quantified 14 apolipoproteins (Apo (a), Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo B100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, Apo E, Apo H, Apo J, Apo L1 and Apo M) and lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) by mass spectrometry in the plasma of 44 COVID-19 patients and sex matched controls. The concentrations of 10 apolipoproteins and LCAT (Figure 2) were significantly modified in COVID-19 patients relative to controls. Plasma concentrations of Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-I, Apo C-II, Apo D, Apo H, Apo J, Apo M and LCAT were significantly reduced in COVID-19 patients, whereas the

Apo E concentration was increased in these patients. Apo B100, Apo L1, Apo C-III and Apo (a) concentrations were not different between groups.



**Figure 1.** Lipid profile changes in plasma of COVID-19 ICU patients. Plasma levels of total cholesterol (a), HDL-cholesterol (HDL-C) (b), LDL-cholesterol (LDL-C) (c) and triglycerides (d) were measured by a routine enzymatic method. A Shapiro–Wilk test for normality was performed followed by an unpaired *t*-test for data with a parametric distribution and a Mann–Whitney test for data with a nonparametric distribution. \*\*\*\*  $p < 0.0001$  comparing control group and COVID-19 patients.

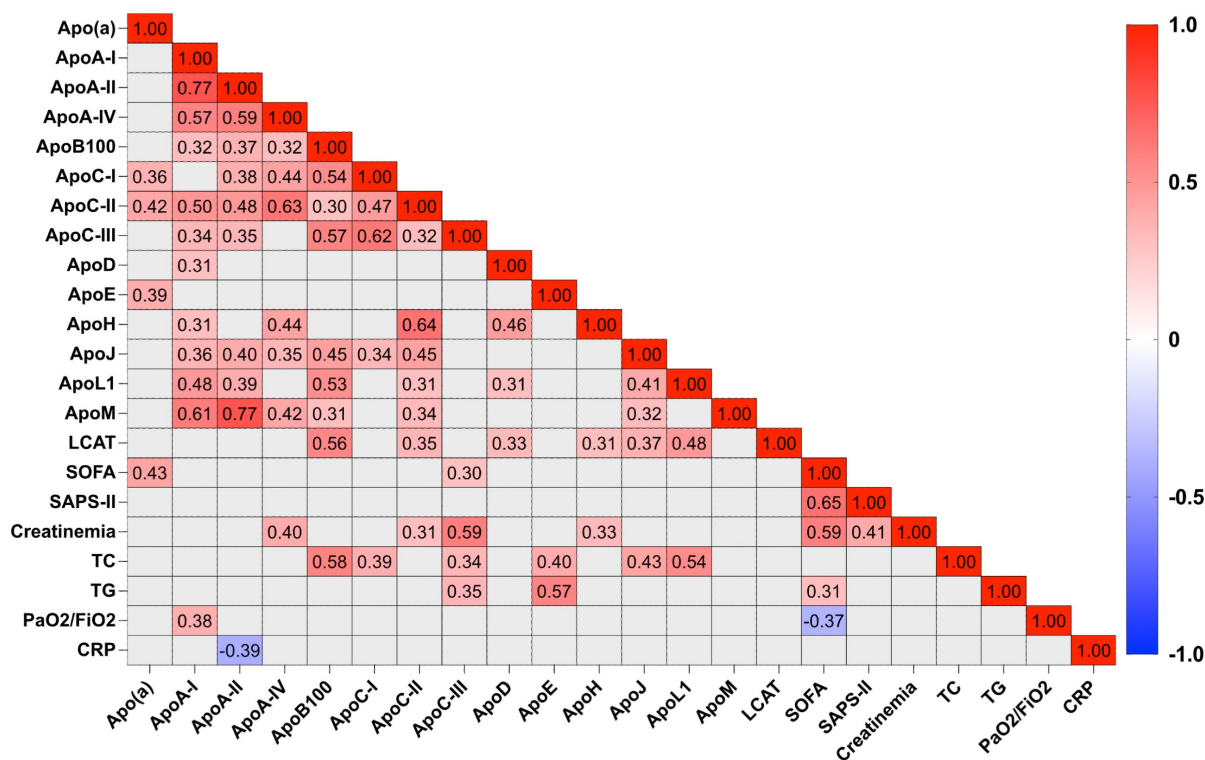


**Figure 2.** Changes in apolipoprotein and LCAT levels in plasma of COVID-19 ICU patients. Fourteen apolipoproteins (a–n) and LCAT (o) were quantified by mass spectrometry in the plasma of 44 COVID-19 ICU patients and 44 controls. A Shapiro–Wilk test for normality was performed followed by an unpaired *t*-test for data with a parametric distribution whereas a Mann–Whitney test was performed for data with a nonparametric distribution. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ns  $p \geq 0.05$  comparing control group and COVID-19 patients.

#### 2.4. Relationship between Apolipoprotein Concentrations and Biological Markers in COVID-19 Patients

Different correlations were performed to identify markers of severity and inflammation associated with lipid and apolipoprotein profiles. The heat map (Figure 3) illustrates the correlations between apolipoproteins/LCAT and seven biological/clinical parameters in COVID-19 patients. Significant positive or negative correlations are colored in red and blue, respectively. Apo (a), Apo C-III and TG concentrations are positively correlated with SOFA scores ( $p < 0.05$ ). Apo A-II concentration is inversely correlated with CRP ( $r = -0.394$ ,

$p < 0.05$ ). Apo A-I is positively correlated with PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ( $r = 0.379$ ,  $p < 0.05$ ). Apo A-IV, Apo H, Apo C-II and Apo C-III concentrations are positively correlated with creatinine concentrations. Apo C-III is more strongly correlated than the other apolipoproteins with creatinine concentration ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.0001$ ). Apo L1, Apo C-I, Apo J, Apo E, LCAT, Apo (a) and Apo B100 correlated positively with LDL-C. The correlation between Apo B100 and LDL-C is greater compared to the other apolipoproteins ( $r = 0.653$ ,  $p < 0.0001$ ). HDL-C is positively correlated with apolipoproteins A-I, M, A-II, L1 and Apo J (clusterin) ( $p < 0.05$ ). As expected, apolipoprotein A-I is strongly correlated with HDL-C ( $r = 0.417$ ,  $p < 0.001$ ). Total cholesterol is positively correlated with Apo L1, Apo J, Apo E, Apo C-I, Apo C-III and Apo B100 ( $p < 0.0001$ ). As expected, apolipoproteins known to be associated with HDL particles were positively correlated between them: Apo A-I with Apo A-II (0.77), A-IV (0.57), C-II (0.5), C-III (0.34), D (0.31), J (0.36), L1 (0.48) and M (0.61) (Supplemental Table S1).



**Figure 3.** Heat map representing correlations between apolipoproteins and selected biological and severity score markers. A Pearson correlation was performed. The positive correlations that are statistically significant are in red, the negative correlations are in blue and non-significant correlations are in grey.

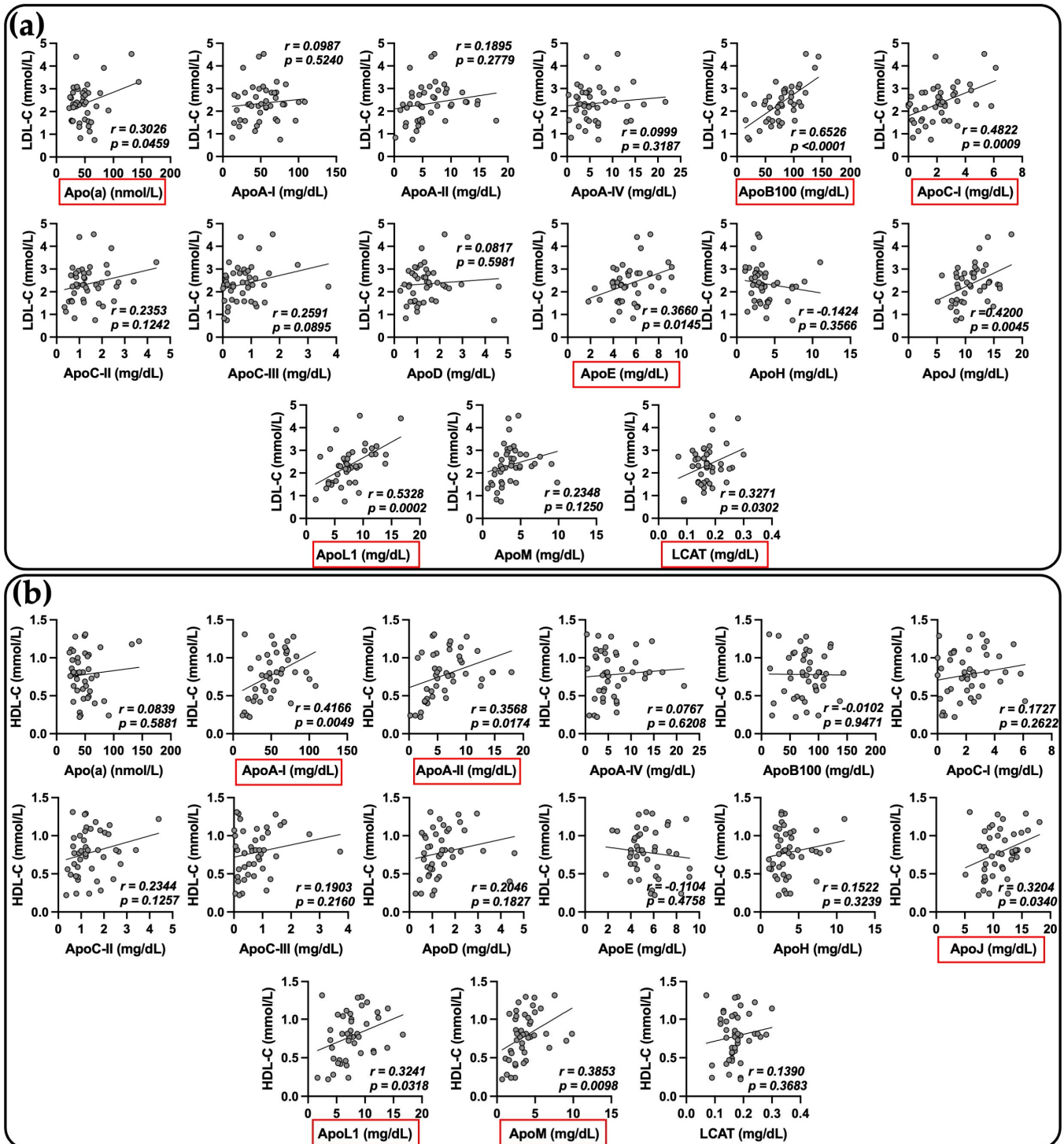
As shown in Figure 4, in COVID-19 patients, LDL-cholesterol concentrations were correlated with Apo (a), Apo B100, Apo C-I, Apo E, Apo L1 and LCAT (Figure 4a). HDL-cholesterol levels positively correlated with Apo A-I, Apo A-II, Apo J, Apo L1 and Apo M (Figure 4b).

### 2.5. Principal Component Analysis (PCA) and Sparse Partial Least Squares Regression Discriminant Analysis (sPLS-DA)

Multivariate analyses were performed on the 44 control subjects and the 44 COVID-19 patients. Principal component analysis (PCA), an unsupervised multivariate statistical method, was applied to different variables in the samples. This method generates principal component (PC) axes that optimally reflect the variability of the data. Different PCAs were performed on the lipid profile (Figure 5a), plasma concentrations of the 14 apolipoproteins and LCAT (Figure 5b), and on the combination of these variables (lipid profile, apolipoprotein and LCAT concentration) (Figure 5c) of controls and COVID-19 patients. The data



show that the two groups could not be clearly separated on the basis of the lipid profile alone (Figure 5a), but they were more separated than on the PCA of the 14 apolipoproteins and LCAT (Figure 5b). The addition of the lipid profile variables to the apolipoprotein and LCAT levels did not improve the separation of the groups by PCA (Figure 5c).



**Figure 4.** Pearson correlations between apolipoprotein concentrations and LDL-C levels (a) and HDL-C levels (b). Quantification of 14 apolipoproteins and LCAT was performed by mass spectrometry directly from the plasma of severe COVID-19 patients. LDL-C and HDL-C levels were measured by routine enzymatic methods. Statistically significant positive correlations are shown in red.

Sparse partial least squares regression discriminant analysis (sPLS-DA), a supervised multivariate statistical analysis, was performed to identify the most discriminating variables for sample classification. The sPLS-DA analysis of the concentrations of the 14 apolipoproteins and LCAT (Figure 5d) discriminates the two groups better than does the PCA analysis. Component 1 (Figure 5e) combines the 10 proteins that distinguish the two groups and their variations within the groups based on the concentrations of the 14 apolipoproteins and LCAT. Component 1 separates the two groups fairly well, except for six COVID-19 patients and six controls (Figure 5d). The 10 components allowing this discrimination are, in order of importance, Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo H, Apo M, Apo C-I, LCAT, Apo E, Apo C-II and Apo (a). The addition of the lipid profile in the sPLS-DA improved grouping, with the presence of only two outliers in each group (Figure 5f). The 10 components contributing to the calculation of component 1 (Figure 5g) are in order of interest as follows: HDL-C, Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, TC, LDL-C, Apo H, Apo M, TG and Apo C-I. This is consistent with the *t*-test analysis performed on the individual markers presented in Figures 1 and 2, showing a decrease in these apolipoproteins in COVID-19 patients and an increase in TG levels.

## 2.6. Relationship between Apolipoprotein Concentrations at Admission and Mortality

Apolipoprotein levels were reduced in COVID-19 patients. Comparisons were carried out between survivors and non-survivors of COVID-19 to identify potential predictive markers for mortality in these patients. In the study population of 44 COVID-19 patients, 32 patients survived while 12 patients did not. The characteristics of COVID-19 patients between survivors and non-survivors are summarized in Table 2.

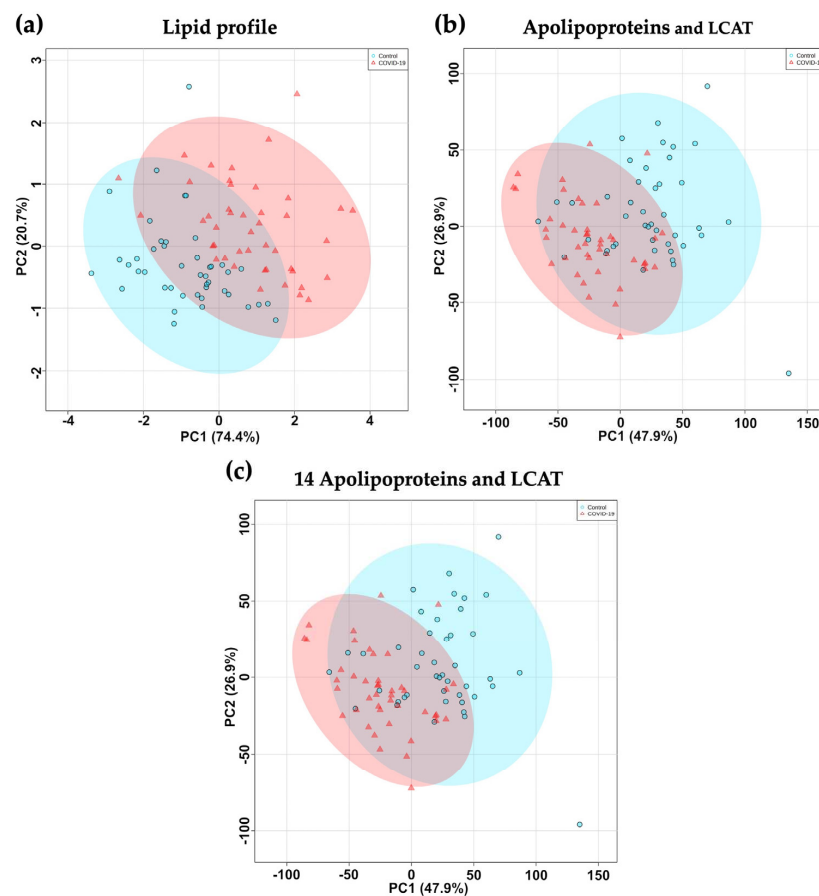
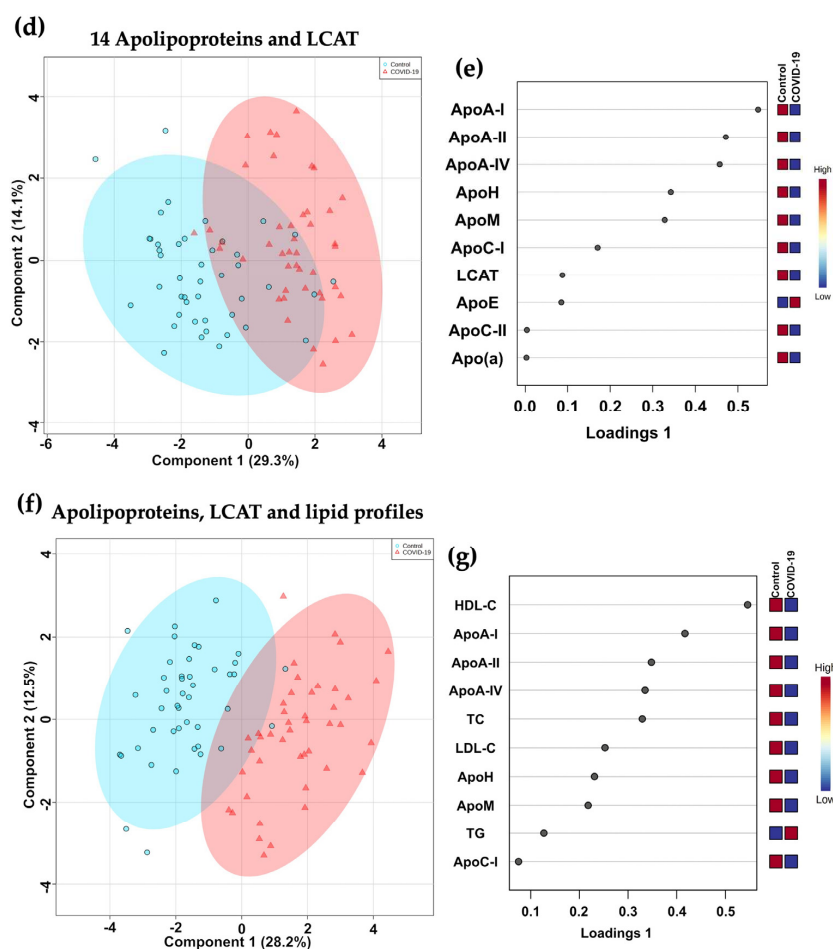


Figure 5. Cont.



**Figure 5.** Multivariate analysis of 14 apolipoproteins, LCAT and lipid concentrations from COVID-19 patients and controls. Samples were collected from control subjects ( $n = 44$ ) and COVID-19 patients ( $n = 44$ ). Principal component analysis (PCA) was performed on the lipid profile (a), plasma concentrations of 14 apolipoproteins and LCAT (b), and the combination of these characteristics (c). Sparse Partial Least Squares Discriminant Analysis (sPLS-DA) of apolipoproteome and plasma LCAT concentration (d) was calculated to identify the contribution of each variable to component 1 (Loading 1) (e). sPLS-DA of apolipoprotein, LCAT, and lipid profiles of COVID-19 and controls (f) was calculated to identify the contribution of each variable to component 1 (Loading 1) (g). Blue circles and red triangles represent the control subjects and COVID-19 patients, respectively.

Only Apo B100 and LCAT levels were significantly decreased in the non-survivors of COVID-19, while all other apolipoprotein levels were comparable between the two groups (Figure 6). The number of patients was not sufficient to perform multi-marker analysis by PCA or sPLS-DA.

**Table 2.** Characteristics of survivors and non-survivors ICU COVID-19 patients.

Characteristics	Survivors ( $n = 32$ )	Non-Survivors ( $n = 12$ )	$p$ -Value
Age, years, median (IQR)	59 (49–67)	68 (65–69)	0.0129
Male sex, $n$ (%)	22 (69)	11 (92)	0.2397
BMI, $\text{kg}/\text{m}^2$ , median (IQR)	31 (26–34)	30 (27–31)	0.3821
<b>Presence of comorbidities</b>			
High blood pressure, $n$ (%)	11 (34)	6 (50)	0.4889
Diabetes mellitus, $n$ (%)	5 (16)	1 (8)	>0.9999

Table 2. Cont.

Characteristics	Survivors (n = 32)	Non-Survivors (n = 12)	p-Value
<b>Medications</b>			
Statin, n (%)	0 (0)	0 (0)	>0.9999
ARA-II, n (%)	4 (13)	4 (33)	0.1847
<b>Severity scores at admission</b>			
SAPS-II, median (IQR)	31 (25–40)	43 (36–47)	0.0152
SOFA score, median (IQR)	3 (3–4)	4 (4–5)	0.0303
<b>Treatments during ICU stay</b>			
Norepinephrine, n (%)	0 (0)	1 (8)	0.2727
Mechanical ventilation, n (%)	7 (22)	6 (50)	0.1347
Length of mechanical ventilation, median [IQR]	0 (0–0)	0 (0–15)	0.2138
Days alive without MV at day 28, median [IQR]	28 (28–28)	5 (3–7)	<0.0001
Tracheostomy, n (%)	4 (13)	1 (8)	>0.9999
ECMO, n (%)	1 (3)	1 (8)	0.4757
RRT, n (%)	3 (9)	0 (0)	0.5506
<b>COVID-19-specific treatments</b>			
Tocilizumab, n (%)	3 (9)	0 (0)	0.5506
Remdesivir, n (%)	0 (0)	1 (8)	0.2727
Corticosteroids, n (%)	32 (100)	12 (100)	>0.9999
<b>Outcome</b>			
ICU LOS (days), median (IQR)	7 (5–17)	8 (3–25)	0.7294
Hospital LOS (days), median (IQR)	12 (7–29)	10 (3–25)	0.0004
Mortality at day-28, n (%)	0 (0)	10 (23)	<0.0001

ARA-II: angiotensin II receptor antagonist; ECMO: extracorporeal membrane oxygenation; ICU: intensive care unit; LOS: length of stay; RRT: renal replacement therapy; SAPS-II: simplified acute physiology score-II; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment.

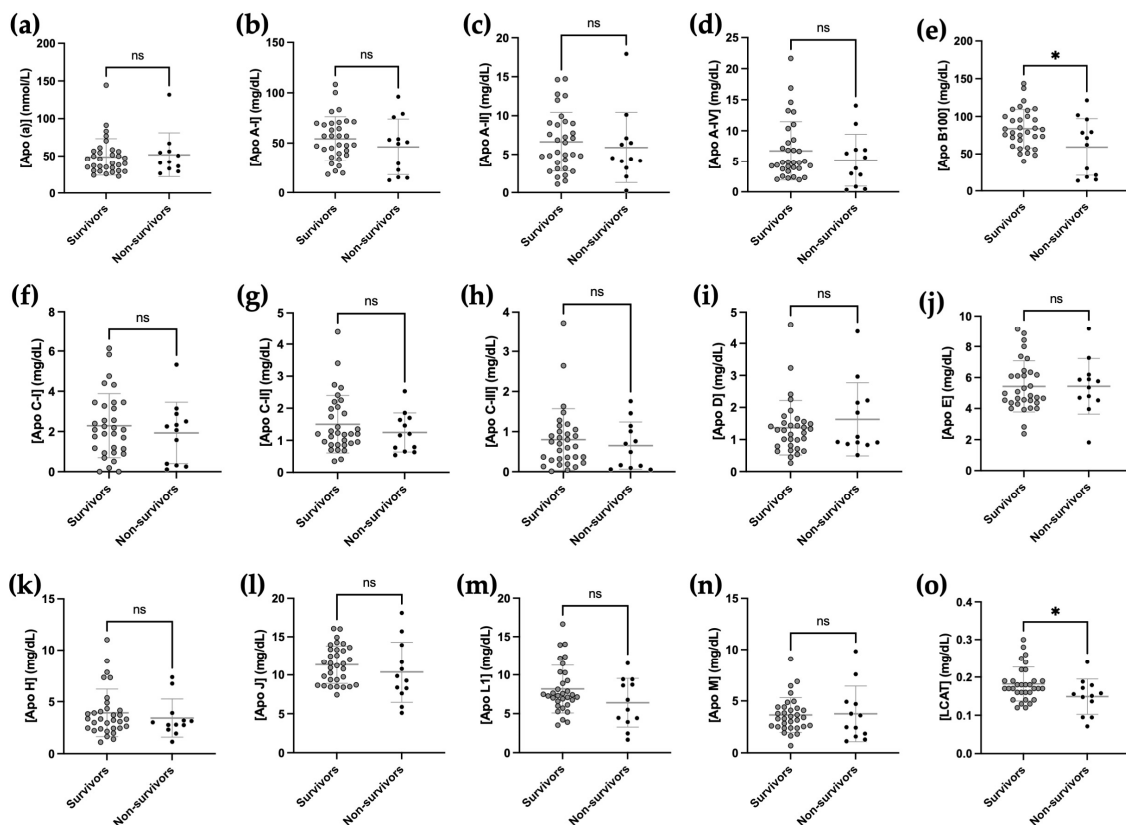


Figure 6. Decreased apolipoprotein B100 and LCAT concentration in plasma of non-survivors

COVID-19. Fourteen apolipoproteins (a–n) and LCAT (o) were measured by mass spectrometry in the plasma of 32 survivor and 12 non-survivor COVID-19 patients at D45. Normality of the data was verified by the Shapiro–Wilk test. An unpaired *t*-test was applied for proteins with a parametric distribution and a Mann–Whitney test was applied for proteins with a nonparametric distribution. \*  $p < 0.05$ , ns  $p \geq 0.05$  compared with the survivor group and non-survivor patients at day 45 COVID-19.

### 3. Discussion

In this work, we show that the lipid profile is strongly altered in severe COVID-19 patients compared to control subjects, reflected by a decrease in HDL-C, LDL-C and total cholesterol and an increase in TG levels. In addition, a decrease in the concentration of nine apolipoproteins and LCAT was found in COVID-19 patients, whereas only Apo E was increased relative to controls. Finally, Apo (a) and Apo C-III positively correlated with severity (SOFA score), whereas Apo B100 and LCAT correlated with mortality at 45 days.

The decrease in TC, HDL-C and LDL-C concentrations during severe COVID-19 pneumonia reported here is consistent with previous studies by our team and others [19,20,24]. The mechanisms underlying the decline in HDL-C levels is poorly described, but some hypotheses have been proposed including the potential consumption of HDL particles, hemodilution, capillary leakage, increased HDL clearance due to upregulation of scavenger receptor class B type 1 (SRB1) expression or decreased HDL synthesis by the liver [17]. Interestingly, capillary leakage and increased vascular permeability has been previously described in COVID-19 patients [35]. The cytokine storm during COVID-19 may also participate in the decrease in lipoprotein cholesterol levels [36]. A direct action of the virus on lipoproteins is also an interesting hypothesis that requires further investigation.

Beyond the cholesterol they carry, the protein moiety of lipoproteins, i.e., apolipoproteins, represents major actors of lipid metabolism. They also exhibit anti-inflammatory, anti-infectious and vasculo-protective properties [37]. We demonstrate here that a majority of apolipoproteins had altered concentrations in COVID-19 patients compared to healthy subjects. Of the 14 apolipoproteins quantified, 9 were decreased (Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-I, Apo C-II, Apo D, Apo H, Apo J and Apo M) and 1 increased during COVID-19 (Apo E). A recent multi-omics study revealed several differences in plasma proteins, lipids and metabolites [38]. Only a few proteomic studies report decreased levels of Apo A-II and Apo M levels in COVID-19 versus non-COVID-19 subjects [38,39]. Shotgun proteomics associated with leukocyte transcripts, lipids and small molecules identified HDL remodeling and clearance pathways as being downregulated according to COVID-19 status and severity. Our results confirm the trends observed in these preliminary open-strategy studies by providing quantitative results with the use of internal standards for each protein tested. Our study is indeed consistent with other studies that have shown a decrease in plasma Apo A-I and unchanged levels of Apo(a) during COVID-19 [26,28,40]. A strong correlation was observed between Apo A-I, Apo A-II and Apo M followed by Apo A-IV and Apo C-II, which are constituent proteins of HDL particles. This is consistent with decreased HDL-C levels observed during COVID-19. Interestingly, Apo C-III, an apolipoprotein associated with triglyceride-rich lipoproteins (TRLs), and to a lesser extent to HDL particles, was not significantly different between the two groups, despite the low HDL levels. This suggests that during COVID-19, Apo C-III would be more associated with TRLs, and could inhibit their catabolism via its function as a lipoprotein lipase inhibitor [41]. This is in agreement with the increased levels of TG in COVID-19 patients. Accordingly, we found that COVID-19 patients had higher plasma ApoE concentration. This apolipoprotein is primarily carried by TRLs, where it serves as a ligand for the ApoB/ApoE receptor (LDL receptor), which also supports the increase in TG during COVID-19.

Although we measured apolipoproteins in plasma and not in isolated LDL or HDL particles, we showed that there was some consistency between lipoprotein cholesterol values and concentrations of their major apolipoproteins. For example, there is a positive correlation between HDL-C and Apo A-I ( $r = 0.4166$ ,  $p = 0.0049$ ) and between LDL-C and

Apo B100 ( $r = 0.6526, p < 0.0001$ ). HDL-C levels are also correlated with Apo A-II, Apo J, Apo L1 and Apo M, whereas LDL-C positively correlates with Apo (a), Apo C-I, Apo E, Apo L1 and LCAT.

Some COVID-19 severity factors such as PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio and SOFA and SAPS-II scores are correlated with plasma concentrations of certain apolipoproteins. Whereas in our study, crude concentrations of HDL-C or LDL-C do not appear to be associated with severity or prognostic factors, some apolipoproteins may be informative. For example, the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio at day 1 is associated with Apo A-I ( $r = 0.379, p = 0.0158$ ), the SOFA score at day 1 is inversely correlated with Apo L1 ( $r = -0.3349, p = 0.0263$ ) and creatinemia at day 1 is associated with Apo C-III concentration ( $r = 0.5949, p < 0.0001$ ). Plasma quantification of apolipoproteins may therefore possibly be more effective than HDL-C and LDL-C concentrations in highlighting elements of severity in the management of COVID-19 patients. We performed both unsupervised principal component analysis (PCA) and supervised sparse (sPLS-DA) least squares discriminant analysis that provided more power to discriminate the groups. Standard statistical analysis (*t*-tests) among COVID-19 patients showed lower of both Apo B100 and LCAT at admission in non-survivors compared with survivors at D45. A more powerful study would be needed to draw stronger conclusions, since PCA and sPLS-DA could not be used for mortality prediction because of the small number of patients in each group (32 survivors and 12 non-survivors).

Our study has several limitations.

This preliminary study deserves an increase in the number of patients to perform a more robust multi-marker statistical analysis to discriminate survivors and non-survivors. This measurement is carried out on a single point giving only a fragmented image, but it would be interesting to carry out a temporal analysis (cohort). This study reports only quantitative data, but it is important to determine the functional capacity of lipoproteins, particularly HDL particles. In this work, we did not isolate HDL or LDL fractions to perform a shotgun proteomic study. It would have been interesting to examine the differences in apolipoprotein composition between the whole plasma and isolated lipoprotein particles. In our study, patients are severe ICU patients. The comparison of apolipoprotein concentrations between COVID-19 patients according to severity (for example ICU vs. non-ICU patients) could have been very informative. It would be interesting to compare the results of our study with those of different validation cohorts, especially in patients with acute inflammation such as bacterial sepsis.

#### 4. Materials and Methods

COVID-19 patients were recruited during the third wave of the outbreak upon admission to intensive care units.

##### 4.1. Study Population

Patients admitted for severe COVID-19 pneumonia were consecutively and prospectively included in the LIPICOR "LIPId profile changes in Inflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2" study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05113836). This study was approved by the competent French ethics committee (Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV, ID-RBC: 2020-A02638-31, approved on 7 December 2020). Written informed consent was obtained from each patient. This is a monocentric study conducted in the surgical ICU of the Bichat Claude-Bernard University Hospital, Paris, France. Patient demographics, simplified acute physiology score II (SAPSII), Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) severity scores and clinical data were collected. Mortality at 28 days, duration of mechanical ventilation, number of days alive without mechanical ventilation at day 28, length of ICU and hospital stay, renal replacement therapy, vasopressor use, need for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) and tracheostomy were collected.

On admission (day 1, D1), 5 mL EDTA blood samples were collected and plasma was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Plasma concentrations of total cholesterol (TC), HDL-C, LDL-C and triglycerides (TG) were measured at D1 in the Biochemistry Laboratory of the Bichat



Claude-Bernard Hospital by routine enzymatic assays (CHOL, HDL-C, LDL-C and TRIG methods, Dimension VISTA System, Siemens Healthineers). The reference values for these assays were as follows: TC < 5.0 mmol/L, HDL-C > 1.00 mmol/L and TG < 1.7 mmol/L. According to the recommendations of the French National Authority for Health 2017 and the European Society of Cardiology 2016, LDL-C concentration targets have been established depending on vascular risk factors [42].

COVID-19 naive control plasma samples from healthy volunteers were obtained from caregivers of the University Hospital Center of Reunion Island (H-COV-RUN Study, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04384705), after obtaining ethics committee approval (Comités de Protection des Personnes, Nord Ouest IV de Lille, France; number EudraCT/ID-RCB 2020-A01253-36). Informed consent was obtained from all participants. Blood was collected in 10 mL EDTA tubes, and the plasma obtained after centrifugation ( $2000\times g$  for 15 min at room temperature) was stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Age, gender, body mass index (BMI) and comorbidities such as diabetes mellitus or high blood pressure were collected for all participants. All methods were performed in accordance with current guidelines and regulations.

#### 4.2. Quantification of Plasma Apolipoprotein Concentration

##### 4.2.1. Plasma Preparation for LC-MS/MS Analysis

Fourteen apolipoproteins (apolipoprotein (Apo) (a), A-I, A-II, A-IV, B100, C-I, C-II, C-III, D, E, H, J, L1 and M) and LCAT (lecithin-cholesterol acyltransferase) were quantified by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) as previously reported [43] with slight modifications. Briefly, high-purity synthetic non-labeled and isotope-labeled peptides with  $^{15}\text{N}$ - and  $^{13}\text{C}$ -labeled arginine and lysine residues provided by Thermo Scientific (Scotland, UK) were resuspended at 1 mM in 50% acetonitrile (ACN) with 0.1% formic acid (FA). Fifteen standards from the unlabeled peptide (light pool) were prepared by serial dilution in distilled water. Isotope-labeled peptides were used as internal standards (ISs). A pool of ISs was diluted in 50 mM ammonium bicarbonate (digestion buffer) and then spiked into each sample to a final concentration of 1.6  $\mu\text{M}$ .

Plasma samples were prepared with the ProteinWorks<sup>TM</sup> eXpress kit (Waters, Milford, MA, USA) according to the supplier's protocol. Plasma proteins were denatured from 30  $\mu\text{L}$  of plasma (diluted 1:3) with 20  $\mu\text{L}$  of RapidGest SD (High) surfactant solution and incubated for 10 min at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sample reduction was performed with 8.75 mM dithiothreitol for 10 min at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The alkylation step was subsequently performed with 15.7 mM iodoacetamide for 30 min in the dark. The proteins were then digested with 20  $\mu\text{L}$  of TPCK (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone, 7  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )-treated trypsin overnight ( $\pm 16\text{ h}$ ) at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Digestion was stopped with 2% trifluoroacetic acid, followed by a 15 min incubation at  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was collected after centrifugation at  $14,000\times g$  for 45 min. Next, the supernatant was cleaned on the Oasis HLB 1 cc, 30 mg vac cartridge (Waters, part number WAT094225). The cartridges were preconditioned and equilibrated before loading the samples (180  $\mu\text{L}$ ). The peptide wash step was performed with 1 mL of 5% methanol before peptide elution was carried out with 500  $\mu\text{L}$  of 80% methanol. The eluted peptides were dried by Speed Vacuum and finally resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of 5% ACN and 0.1% FA for mass spectrometry analysis.

##### 4.2.2. Mass Spectrometry Analysis

Samples were separated by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to a Q-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Briefly, 30  $\mu\text{L}$  of tryptic peptides were injected into a UPLC system equipped with a Thermo Fisher Ultimate 3000 series WPS-3000 RS autosampler and separated on Aeris<sup>®</sup> PEPTIDE XB-C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ , 100 mm  $\times$  2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Three linear gradients were used to elute peptides. First, a gradient starting with 1% to 8% solution B (0.1% FA in 100% ACN) for 1.50 min, next 8% to 29% solution B for 8.50 min, and 29%

to 95% solution B for 1 min. A column wash step was then performed for 2.30 min with 95% solution B. To avoid potential contamination, a blank was added every 10 samples. The flow rate was set at 350  $\mu\text{L}/\text{min}$  and the column temperature was fixed at 60  $^{\circ}\text{C}$ . For mass spectrometer parameters, heated electrospray ionization (HESI) was set at 3.5 kV, the capillary temperature was adjusted to 300  $^{\circ}\text{C}$  and the S-lens RF was equal to 50%. A targeted mass spectrometry quantification via time-scheduled parallel reaction monitoring (PRM) method was used to analyze the samples. Full MS/MS spectra were acquired at a resolving power of 17,500 (at  $m/z$  200) with automatic gain control (AGC) set to  $2 \times 10^5$  and a maximum injection time (max IT) of 120 ms. The precursor ion of each targeted peptide was extracted using a 3.0  $m/z$  isolation window. Peptides were fragmented by higher-energy collisional dissociation (HCD) with a suitable normalized collision energy between 16 and 35 eV.

Apolipoprotein elution and quantification were performed in two separate runs to avoid co-elution and to improve sensitivity, accuracy and precision.

Data processing was achieved using Skyline software (version 21.1.0.146, MacCoss Lab, Seattle, WA, USA). Apolipoprotein and LCAT quantifications were calculated by plotting the peak intensity ratios of light peptide (sum of selected Y ions) to the heavy peptide (sum of selected Y ions) as a function of analyte concentrations with linear regression (1/X weighting, linear through zero). The calibration curve for each peptide had a correlation coefficient (R squared) > 0.95.

#### 4.3. Statistical Analysis

Multivariate statistical analysis was performed on 19 variables, including concentrations of 14 apolipoproteins, LCAT and lipid profiles (TG, TC, HDL-C and LDL-C) of control and COVID-19 subjects, using the MetaboAnalyst 5.0 data analysis platform (<https://www.metaboanalyst.ca>, accessed on 2 December 2022). Principal component analysis (PCA) was performed to group patients with minimal loss of information and to visualize similarity between variables [44]. Then, the most discriminating parameters were determined using sparse partial least squares regression discriminant analysis (sPLS-DA) [45]. These different multivariate statistics were used to optimize the segregation of the two groups (control vs. COVID-19).

The remaining statistical analyses were performed with Prism (GraphPad© Software Inc., San Diego, CA, USA). Continuous variables were expressed as medians and interquartile ranges (IQRs). The Shapiro–Wilk test was performed to test the normality of data, and then, a Mann–Whitney or an unpaired  $t$ -test was performed to compare data with a nonparametric distribution or a normal distribution, respectively. These different tests were used to compare COVID-19 patients versus controls;  $p$ -values < 0.05 were required for statistical significance. Spearman’s test was used for non-parametric assessment of correlations.

## 5. Conclusions

In conclusion, our study confirmed that the lipid profile is profoundly altered in severe COVID-19 patients compared with control subjects. We measured for the first time a large panel of apolipoproteins in the plasma of these patients and found that nine of them are decreased and only one increased (Apo E) in the context of COVID-19. Several correlations were described, and two markers (Apo B100 and LCAT) had lower levels at admission in patients who did not survive to 45 days. A larger cohort of patients is needed to refine our results, especially for multivariate analyses. In addition, characterization of the apolipoprotein composition of isolated lipoproteins may also be relevant.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24054605/s1>.



**Author Contributions:** O.M., D.C. and S.T. designed the study. F.B., K.C., B.V. and T.R. acquired the data. F.B., O.M., B.V. and S.T. analyzed the data. B.L.-J., A.T.-D., T.R., N.Z., A.S. and M.L.-X. participated in the patient inclusions and biochemical analyses with supervision. S.T., P.M., F.B., S.T. and O.M. wrote the manuscript. P.R. and P.M. critically reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** F.B. and K.C. are supported by a grant from the Région Réunion for their PhD (European Union- Région Reunion). This research was funded by FEDER "LIPICOR" RE0027600 and "TFORCE-COVIR" RE0027601 (EU—Région Réunion—French State national counterpart), and by the BIOST Fédération.

**Institutional Review Board Statement:** This study was approved by the competent French ethics committee (Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV, ID-RBC: 2020-A02638-31, approved on 7 December 2020). Written informed consent was obtained from each patient.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

**Acknowledgments:** The sponsors of the LIPICOR and H-COV-RUN studies were Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation) and CHU de La Réunion, respectively. We thank Nicolas Bouscaren, Maxime Cournot and Lucie Auzanneau for their help in methodology and project management (H-COV-RUN study).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interests.

## Abbreviations

Apo	apolipoprotein
COVID-19	coronavirus disease 2019
ECMO	extracorporeal membrane oxygenation
HDL-C	high-density lipoprotein cholesterol
HDL	high-density lipoprotein
ICU	intensive care unit
LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL-C	low-density lipoprotein cholesterol
LDL	low-density lipoproteins
LOS	length of stay
PCA	principal component analysis
RRT	renal replacement therapy
SAPS-II	simplified acute physiology score-II
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
sPLS-DA	sparse partial least squares discriminant analysis
TC	total cholesterol
TG	triglycerides
UPLC-MS/MS	ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry
ARA-II	angiotensin II receptor antagonist

## References

1. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.-W.; Tian, J.-H.; Pei, Y.-Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Perreau, M.; Suffiotti, M.; Marques-Vidal, P.; Wiedemann, A.; Levy, Y.; Laouénan, C.; Ghosn, J.; Fenwick, C.; Comte, D.; Roger, T.; et al. The cytokines HGF and CXCL13 predict the severity and the mortality in COVID-19 patients. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. The RECOVERY Collaborative Group. Dexamethasone in Hospitalized Patients with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 693–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Hammond, J.; Leister-Tebbe, H.; Gardner, A.; Abreu, P.; Bao, W.; Wisemandle, W.; Baniecki, M.; Hendrick, V.M.; Damle, B.; Simón-Campos, A.; et al. Oral Nirmatrelvir for High-Risk, Nonhospitalized Adults with COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *386*, 1397–1408. [[CrossRef](#)]
6. Alaupovic, P. The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2003**, *5*, 459–467. [[CrossRef](#)]
7. Kastelein, J.J.P.; van der Steeg, W.A.; Holme, I.; Gaffney, M.; Cater, N.B.; Barter, P.; Deedwania, P.; Olsson, A.G.; Boekholdt, S.M.; Demicco, D.A.; et al. Lipids, apolipoproteins, and their ratios in relation to cardiovascular events with statin treatment. *Circulation* **2008**, *117*, 3002–3009. [[CrossRef](#)]
8. Alaupovic, P. [2] Significance of apolipoproteins for structure, function, and classification of plasma lipoproteins. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 1996; Volume 263, pp. 32–60. ISBN 978-0-12-182164-7.
9. Segrest, J.P.; Jones, M.K.; De Loof, H.; Dashti, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1346–1367. [[CrossRef](#)]
10. van der Vorst, E.P.C. High-Density Lipoproteins and Apolipoprotein A1. In *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins*; Hoeger, U., Harris, J.R., Eds.; Subcellular Biochemistry; Springer: Cham, Switzerland, 2020; Volume 94, pp. 399–420. ISBN 978-3-030-41768-0.
11. Tanaka, S.; Diallo, D.; Delbosc, S.; Genève, C.; Zappella, N.; Yong-Sang, J.; Patche, J.; Harrois, A.; Hamada, S.; Denamur, E.; et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann. Intensive Care* **2019**, *9*, 68. [[CrossRef](#)]
12. Tanaka, S.; Stern, J.; Bouzid, D.; Robert, T.; Dehoux, M.; Snauwaert, A.; Zappella, N.; Cournot, M.; Lortat-Jacob, B.; Augustin, P.; et al. Relationship between lipoprotein concentrations and short-term and 1-year mortality in intensive care unit septic patients: Results from the HIGHSEPS study. *Ann. Intensive Care* **2021**, *11*, 11. [[CrossRef](#)]
13. Chenaud, C.; Merlani, P.G.; Roux-Lombard, P.; Burger, D.; Harbarth, S.; Luyasu, S.; Graf, J.-D.; Dayer, J.-M.; Ricou, B. Low apolipoprotein A-I level at intensive care unit admission and systemic inflammatory response syndrome exacerbation. *Crit. Care Med.* **2004**, *32*, 632–637. [[CrossRef](#)]
14. Barlage, S.; Gnewuch, C.; Liebisch, G.; Wolf, Z.; Audebert, F.X.; Gluck, T.; Frohlich, D.; Kramer, B.K.; Rothe, G.; Schmitz, G. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med.* **2009**, *35*, 1877–1885. [[CrossRef](#)]
15. Chien, J.Y.; Jerng, J.S.; Yu, C.J.; Yang, P.C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit. Care Med.* **2005**, *33*, 1688–1693. [[CrossRef](#)]
16. Guirgis, F.W.; Dodani, S.; Leeuwenburgh, C.; Moldawer, L.; Bowman, J.; Kalynych, C.; Grijalva, V.; Reddy, S.T.; Jones, A.E.; Moore, F.A. HDL inflammatory index correlates with and predicts severity of organ failure in patients with sepsis and septic shock. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0203813. [[CrossRef](#)]
17. Tanaka, S.; Couret, D.; Tran-Dinh, A.; Duranteau, J.; Montravers, P.; Schwendeman, A.; Meilhac, O. High-density lipoproteins during sepsis: From bench to bedside. *Crit. Care* **2020**, *24*, 134. [[CrossRef](#)]
18. Fan, J.; Wang, H.; Ye, G.; Cao, X.; Xu, X.; Tan, W.; Zhang, Y. Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metab. Clin. Exp.* **2020**, *107*, 154243. [[CrossRef](#)]
19. Wei, X.; Zeng, W.; Su, J.; Wan, H.; Yu, X.; Cao, X.; Tan, W.; Wang, H. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *J. Clin. Lipidol.* **2020**, *14*, 297–304. [[CrossRef](#)]
20. Hu, X.; Chen, D.; Wu, L.; He, G.; Ye, W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *510*, 105–110. [[CrossRef](#)]
21. Feingold, K.R. Lipid and Lipoprotein Levels in Patients with COVID-19 Infections. In *Endotext*; Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., et al., Eds.; MDText.com, Inc.: South Dartmouth, MA, USA, 2000.
22. Masana, L.; Correig, E.; Ibarretxe, D.; Anoro, E.; Arroyo, J.A.; Jericó, C.; Guerrero, C.; la Miret, M.; Näf, S.; Pardo, A.; et al. Low HDL and high triglycerides predict COVID-19 severity. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7217. [[CrossRef](#)]
23. Zhao, M.; Luo, Z.; He, H.; Shen, B.; Liang, J.; Zhang, J.; Ye, J.; Xu, Y.; Wang, Z.; Ye, D.; et al. Decreased Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level Indicates Poor Prognosis of Severe and Critical COVID-19 Patients: A Retrospective, Single-Center Study. *Front. Med.* **2021**, *8*, 585851. [[CrossRef](#)]
24. Tanaka, S.; De Tymowski, C.; Assadi, M.; Zappella, N.; Jean-Baptiste, S.; Robert, T.; Peoc'h, K.; Lortat-Jacob, B.; Fontaine, L.; Bouzid, D.; et al. Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0239573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gong, J.; Chen, Y.; Jie, Y.; Tan, M.; Jiang, Z.; Yuan, L.; Cao, J.; Li, G.; Chong, Y.; Qu, J.; et al. U-Shaped Relationship of Low-Density Lipoprotein Cholesterol With Risk of Severe COVID-19 From a Multicenter Pooled Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 604736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cho, K.-H. Importance of Apolipoprotein A-I and A-II Composition in HDL and Its Potential for Studying COVID-19 and SARS-CoV-2. *Medicines* **2021**, *8*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhu, Z.; Yang, Y.; Fan, L.; Ye, S.; Lou, K.; Hua, X.; Huang, Z.; Shi, Q.; Gao, G. Low serum level of apolipoprotein A1 may predict the severity of COVID-19: A retrospective study. *J. Clin. Lab. Anal.* **2021**, *35*, e23911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Poynard, T.; Deckmyn, O.; Rudler, M.; Peta, V.; Ngo, Y.; Vautier, M.; Akhavan, S.; Calvez, V.; Franc, C.; Castille, J.M.; et al. Performance of serum apolipoprotein-A1 as a sentinel of COVID-19. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0242306. [[CrossRef](#)]
29. Li, Y.; Zhang, Y.; Lu, R.; Dai, M.; Shen, M.; Zhang, J.; Cui, Y.; Liu, B.; Lin, F.; Chen, L.; et al. Lipid metabolism changes in patients with severe COVID-19. *Clin. Chim. Acta* **2021**, *517*, 66–73. [[CrossRef](#)]
30. Masuda, R.; Lodge, S.; Nitschke, P.; Spraul, M.; Schaefer, H.; Bong, S.-H.; Kimhofer, T.; Hall, D.; Loo, R.L.; Bizkarguenaga, M.; et al. Integrative Modeling of Plasma Metabolic and Lipoprotein Biomarkers of SARS-CoV-2 Infection in Spanish and Australian COVID-19 Patient Cohorts. *J. Proteome Res.* **2021**, *20*, 4139–4152. [[CrossRef](#)]
31. Ballout, R.A.; Kong, H.; Sampson, M.; Otvos, J.D.; Cox, A.L.; Agbor-Enoh, S.; Remaley, A.T. The NIH Lipo-COVID Study: A Pilot NMR Investigation of Lipoprotein Subfractions and Other Metabolites in Patients with Severe COVID-19. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1090. [[CrossRef](#)]
32. Begue, F.; Tanaka, S.; Mouktadi, Z.; Rondeau, P.; Veeren, B.; Diotel, N.; Tran-Dinh, A.; Robert, T.; Vélia, E.; Mavingui, P.; et al. Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2291. [[CrossRef](#)]
33. Souza, D.R., Jr.; Silva, A.R.M.; Rosa-Fernandes, L.; Reis, L.R.; Alexandria, G.; Bhosale, S.D.; Ghilardi, F.d.R.; Dalçóquio, T.F.; Bertolin, A.J.; Nicolau, J.C.; et al. HDL proteome remodeling associates with COVID-19 severity. *J. Clin. Lipidol.* **2021**, *15*, 796–804. [[CrossRef](#)]
34. Dominiczak, M.H.; Caslake, M.J. Apolipoproteins: Metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* **2011**, *48*, 498–515. [[CrossRef](#)]
35. Tian, S.; Hu, W.; Niu, L.; Liu, H.; Xu, H.; Xiao, S.-Y. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2020**, *15*, 700–704. [[CrossRef](#)]
36. Sorokin, A.V.; Karathanasis, S.K.; Yang, Z.-H.; Freeman, L.; Kotani, K.; Remaley, A.T. COVID-19—Associated dyslipidemia: Implications for mechanism of impaired resolution and novel therapeutic approaches. *FASEB J.* **2020**, *34*, 9843–9853. [[CrossRef](#)]
37. Mehta, A.; Shapiro, M.D. Apolipoproteins in vascular biology and atherosclerotic disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **2022**, *19*, 168–179. [[CrossRef](#)]
38. Overmyer, K.A.; Shishkova, E.; Miller, I.J.; Balnis, J.; Bernstein, M.N.; Peters-Clarke, T.M.; Meyer, J.G.; Quan, Q.; Muehlbauer, L.K.; Trujillo, E.A.; et al. Large-Scale Multi-omic Analysis of COVID-19 Severity. *Cell Syst.* **2021**, *12*, 23–40.e7. [[CrossRef](#)]
39. Messner, C.B.; Demichev, V.; Wendisch, D.; Michalick, L.; White, M.; Freiwald, A.; Textoris-Taube, K.; Vernardis, S.I.; Egger, A.-S.; Kreidl, M.; et al. Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. *Cell Syst.* **2020**, *11*, 11–24.E4. [[CrossRef](#)]
40. Di Maio, S.; Lamina, C.; Coassin, S.; Forer, L.; Würzner, R.; Schönherr, S.; Kronenberg, F. Lipoprotein(a) and SARS-CoV-2 infections: Susceptibility to infections, ischemic heart disease and thromboembolic events. *J. Intern. Med.* **2022**, *291*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Dib, I.; Khalil, A.; Chouaib, R.; El-Makhour, Y.; Nouredine, H. Apolipoprotein C-III and cardiovascular diseases: When genetics meet molecular pathologies. *Mol. Biol. Rep.* **2021**, *48*, 875–886. [[CrossRef](#)]
42. Catapano, A.L.; Graham, I.; De Backer, G.; Wiklund, O.; Chapman, M.J.; Drexel, H.; Hoes, A.W.; Jennings, C.S.; Landmesser, U.; Pedersen, T.R.; et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur. Heart J.* **2016**, *37*, 2999–3058. [[CrossRef](#)]
43. Blanchard, V.; Garçon, D.; Jaunet, C.; Chemello, K.; Billon-Crossouard, S.; Aguesse, A.; Garfa, A.; Famchon, G.; Torres, A.; Le May, C.; et al. A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 1128–1139. [[CrossRef](#)]
44. Jolliffe, I.T.; Cadima, J. Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374*, 20150202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lê Cao, K.-A.; Boitard, S.; Besse, P. Sparse PLS discriminant analysis: Biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**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.





## C. Discussions et perspectives

Lors de cette première étude, nous avons confirmé que les patients COVID-19, admis en service de réanimation pour des symptômes sévères, présentaient une dyslipidémie qui se caractérise par des concentrations basses en TC, LDL-C, HDL-C et des concentrations élevées en TG. Cette étude montre également des changements importants des concentrations plasmatiques des apolipoprotéines au cours cette infection sévère par le virus SARS-CoV-2. En effet, la concentration de neuf apolipoprotéines et de la LCAT sont retrouvées diminuées alors que celle de l'Apo E est augmentée et une corrélation particulière entre l'Apo C-III et l'Apo (a) a été déterminée avec le score SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*).

Ce type d'altération du profil lipidique a déjà été rapporté dans de nombreuses études portant sur la COVID-19 avec notamment une association entre les concentrations basses en HDL-C et LDL-C et la sévérité de la maladie (**Chidambaram et al. 2022**). En effet, ces concentrations de LDL-C et HDL-C continuent de diminuer progressivement chez les patients qui ne survivent pas (**Wei et al. 2020; Fan et al. 2020; Tanaka et al. 2020b**). Cependant, l'origine de la chute des concentrations en cholestérol chez les patients COVID-19 reste encore méconnue. C'est pourquoi nous avons exploré les changements des concentrations des apolipoprotéines chez ces patients.

L'ensemble de des apolipoprotéines que nous avons retrouvé diminuées dans notre étude sont associées aux HDL. Les Apo A (I, II, IV), C (I, II) sont aussi connues pour être associées aux TRL (**Dominiczak and Caslake 2011**). La principale apolipoprotéine dont la concentration est augmentée est l'Apo E qui est présente sur les HDL, chylomicron, les VLDL et les IDL. Cette apolipoprotéine participe à la clairance des HDL et des TRL par son interaction avec ses récepteurs spécifiques (**Mahley et al. 1979; Chroni et al. 2005; Ulrich et al. 2014**). Ce processus de clairance pourrait participer à la diminution des concentrations en HDL-C au cours de l'infection. De plus, la concentration en LCAT est également diminuée parallèlement à ses activateurs que sont l'Apo A-I, l'Apo A-II, l'Apo A-IV et l'Apo C-I. Bien que la LCAT soit également activable par l'Apo E qui est la seule apolipoprotéine augmentée lors de l'inflammation, la diminution des concentrations de la LCAT engendre une diminution de son activité (**Jonas 1991**). Ainsi, les pré $\beta$ -HDL sont moins converties en HDL sphériques via la LCAT, favorisant le catabolisme des pré $\beta$ -HDL et réduisant ainsi les concentrations en HDL. Afin de confirmer cette hypothèse, il est nécessaire de réaliser une quantification par RMN,

du nombre de particules des différentes sous-populations de HDL dans le plasma de ces patients COVID-19. Pour des raisons techniques, il n'a pas été possible de réaliser cette méthode d'analyse par RMN à l'aide d'un module IVDr B.I. LISA dans la période de ma thèse pour confirmer notre hypothèse sur cette étude. Cependant nous avons utilisé une méthode alternative reposant sur la technique d'électrophorèse en tube sur gel polyacrylamide en conditions non-dénaturantes pour l'analyse des sous-populations de lipoprotéines que nous développerons dans la partie II.

La corrélation positive que l'on observe entre la concentration de HDL-C et l'Apo A-I, l'Apo A-II, l'Apo J et l'Apo M montre leur association potentielle avec les HDL. Afin de confirmer cette association, il est nécessaire d'effectuer l'isolement des HDL du plasma pour réaliser ensuite une analyse de type "shotgun proteomic" qui permettrait d'avoir une vue d'ensemble des modifications protéiques des HDL des patients COVID-19.

Concernant l'Apo C-I qui est également diminuée, celle-ci est un inhibiteur de l'activité CETP. Il est établi que l'inhibition de la CETP contribue à une augmentation des niveaux de HDL-C (**Gautier et al. 2000; Tall and Rader 2018**) et qu'elle contribue à l'enrichissement en TG des HDL, qui sont par la suite hydrolysées par l'HL. Les inhibiteurs de l'HL sont les Apo C-I, C-III et l'Apo A-II (**Jahn et al. 1983; Clay et al. 1992; Rouhani et al. 2008**). La diminution de la concentration en Apo C-I et Apo A-II que l'on observe au cours de la COVID-19, laisse présager d'une augmentation des concentrations en TG, notamment au sein des HDL, du fait de l'absence d'inhibition de la CETP et de l'HL. Ces HDL riches en TG contribuent potentiellement à l'augmentation des TG circulant. Afin de confirmer notre hypothèse, il faudrait quantifier la CETP ou évaluer l'impact de l'infection sur son activité dans le plasma des patients COVID-19. Nous émettons l'hypothèse que les résultats que l'on obtiendrait dans ce sepsis viral seraient similaires à ceux obtenus au cours d'un sepsis bactérien. Dans le sepsis bactérien, l'activité de la CETP et de la LCAT, ainsi que l'expression des récepteurs contribuant à la clairance des HDL sont diminués, participant à la formation de particules de HDL enrichies en protéines de la phase aiguë (**Trinder et al. 2019**).

Les concentrations en LDL-C diminuent drastiquement au cours de la COVID-19, cependant, nous avons constaté que la concentration en Apo B100 n'est pas modifiée. Sachant que les VLDL, IDL et LDL ne peuvent contenir qu'une seule molécule d'Apo B100, cela suppose que le nombre de particules LDL reste inchangé (**Elovson et al. 1988; Dominiczak and Caslake 2011**). Il serait donc nécessaire d'effectuer une analyse des sous-populations de ces

lipoprotéines par RMN afin d'avoir le nombre de particules de ces différentes classes de lipoprotéines. Le module RMN IVDr B.I. LISA pourrait nous donner la composition lipidique (TG, cholestérol, phospholipides) de l'ensemble des sous-classes de lipoprotéines (VLDL, IDL, LDL et HDL).

L'Apo A-IV et l'Apo C-II sont des activateurs de la LPL (**Goldberg et al. 1990**). La LPL hydrolyse les TG des VLDL et contribue à la formation des IDL en réduisant ainsi la concentration en TG (**Feingold 2000**). Cependant, nous avons montré que chez les patients COVID-19, la concentration en Apo A-IV et C-II était diminuée. La réduction de la concentration de ces deux apolipoprotéines engendre donc une diminution de l'activité de la LPL conduisant à une augmentation des TG et une diminution des niveaux de HDL-C et de LDL. L'absence de variation au niveau de l'Apo C-III qui est davantage associée aux TRL qu'aux HDL pourrait inhiber leur catabolisme en raison de leur fonction inhibitrice de la LPL (**McConathy et al. 1992; Clavey et al. 1995**).

Les corrélations positives que l'on a établies entre les Apo (a), B100, C-I, E, L1, LCAT et les concentrations de LDL-C semblent cohérentes car celles-ci sont possiblement portées par cette classe de lipoprotéines. Cependant, pour confirmer leur association avec ces apolipoprotéines, l'isolement de ces lipoprotéines et l'analyse de leur protéome sont essentiels.

Pour aller plus loin dans notre étude, nous avons réalisé des analyses statistiques multivariées, analyse en composante principale (ACP) et une analyse discriminante par moindres carrés partiels parcimonieux (sPLS-DA) afin d'identifier les variables les plus discriminantes. Nous avons pu constater que les concentrations en Apo A I et Apo A II apparaissent les plus discriminantes par rapport aux autres apolipoprotéines, d'autant plus que ce sont les deux apolipoprotéines majoritaires des HDL. Néanmoins, la concentration en HDL-C reste la variable la plus discriminante entre les patients COVID-19 et les sujets sains de notre étude.

Le design de l'étude a été défini pour étudier les variations entre les patients COVID-19 sévères et les sujets sains. Ce design n'est pas optimal pour observer les différences en fonction de la survie des patients. Nous avons, tout de même, poussé l'analyse en stratifiant le groupe des malades en fonction de leur survie afin d'étudier ces différences en apolipoprotéines de ces groupes. Nous avons observé qu'entre survivants et non-survivants, les patients ne présentaient pas de différences significatives au niveau du profil lipidique à



leur admission en service de réanimation. En revanche, nous avons remarqué des concentrations en Apo B100 et en LCAT plus élevées chez les survivants comparés aux non-survivants. Cependant, une méta-analyse réalisée par Ulloque-Badaracco et al. n'a montré aucune association significative entre la concentration en Apo B et l'augmentation du risque de décès chez les patients COVID-19 (Ulloque-Badaracco et al. 2021). Pour confirmer nos résultats, l'analyse d'un plus grand échantillon de patients COVID-19 survivants et non-survivants serait nécessaire.

Afin d'affiner nos résultats, il aurait également été intéressant d'effectuer l'analyse de l'apolipoprotéome chez des patients avec différentes gradations des symptômes et cela dès les premiers jours de l'infection. Pour la gradation, la disponibilité de prélèvements plasmatiques de patients COVID-19 présentant soit la forme asymptomatique, soit une grippe sévère, ou bien des formes aiguës et des non-survivants, aurait permis d'évaluer une modification graduelle des apolipoprotéines afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques. Aussi, un suivi dans le temps aurait été pertinent afin d'évaluer si le métabolisme des lipoprotéines retrouve un fonctionnement et un niveau normal après l'épisode aigu de COVID-19. De récentes études montrent que les patients souffrant d'un COVID-19 long possèdent encore des profils lipidiques altérés (Berezhnoy et al. 2023; Durrington 2023). Une récente étude transversale révèle que même après une année de COVID long, les patients atteints de cette maladie possèdent des concentrations basses en HDL-C, alors que les concentrations en triglycérides et LDL-C retournent à la normale (de Menezes et al. 2023). Cette disparité montre l'importance d'explorer de manière approfondie les HDL des patients, visant à évaluer les éventuelles altérations de la qualité des HDL et considérer l'utilisation d'une thérapie reposant sur la supplémentation en HDL en vue d'augmenter les concentrations en HDL-C et en particules de HDL fonctionnelles.

Cependant, notre étude présente **quelques limites** :

Nous ne disposons pas des différents dosages de corticoïdes que les patients ont pu recevoir au cours de leur traitement en réanimation. L'ajout de cette donnée aurait permis de stratifier les groupes en fonction des doses administrées.

De plus, notre étude monocentrique a été réalisée à un seul temps correspondant au moment de l'admission des patients en services de réanimation. La mise à disposition d'échantillons durant toute la période d'hospitalisation en réanimation aurait pu nous informer sur l'évolution du métabolisme des lipoprotéines par les dosages des différentes apolipoprotéines pendant la phase de rétablissement.

Mais, l'une des limites les plus importantes, est le type "ciblé" de notre analyse des apolipoprotéines plasmatiques. Il aurait été intéressant de réaliser une analyse de type "sans a priori" sur le plasma de ces patients afin de pouvoir identifier de nouvelles protéines marqueurs de la COVID-19.

En conclusion de cette première partie, l'apolipoprotéome des patients COVID-19 se retrouve fortement altéré, reflétant un désordre important du métabolisme des lipoprotéines et expliquant potentiellement les modifications du profil lipidique des patients. La modification des concentrations en enzyme impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines comme la LCAT laisse la porte ouverte vers de nouvelles thérapies reposant sur l'injection d'enzymes impliquées dans le métabolisme des HDL comme de la LCAT recombinante ou d'inhibiteur de la CETP. L'augmentation de HDL circulantes permettrait de renouveler le pool de HDL fonctionnelles chez ces patients en situation de sepsis viral et permettrait également de diminuer l'inflammation ainsi que le phénomène oxydatif causé par l'infection par le biais des propriétés pléiotropes des HDL.

Dans cette première étude, nous avons montré que la plupart des apolipoprotéines modifiées était associée aux HDL et à leur métabolisme. Aussi, l'Apo B100 et la LCAT étaient retrouvées diminuées chez les patients n'ayant pas survécu à la COVID-19. Néanmoins dans cette étude, l'analyse a été réalisée sur plasma total, il apparaît donc pertinent d'approfondir l'analyse directement sur les lipoprotéines qui seront isolées du plasma de ces patients COVID-19 lors d'une étude spécifique du protéome.



**PARTIE II. ALTÉRATION DE LA  
COMPOSITION ET DES FONCTIONS  
DES LIPOPROTÉINES AU COURS  
DE LA COVID-19 SÉVÈRE**



## A. Introduction et objectifs

Au cours de notre précédente étude, nous avons pu montrer une altération significative de l'apolipoprotéome des patients atteints de COVID-19, reflétant des désordres au niveau du métabolisme des lipoprotéines. Cette première étude a renforcé notre intérêt à poursuivre notre recherche d'impact de la COVID 19 sur le contenu des particules lipoprotéiques en elles même justifiant leur isolement spécifique.

De nombreuses études ont recensé des modifications du profil lipidique dans le contexte de la COVID-19. Parmi ces modifications, des concentrations en HDL-C et LDL-C retrouvées drastiquement diminuées continuent de décroître en cas de mauvais pronostic ou mort des patients (**Fan et al. 2020; Hu et al. 2020; Wang et al. 2020**). De plus, comme au cours d'un sepsis, les diminutions des concentrations d'albumine et des lipoprotéines s'accompagnent de la sécrétion abondante dans le sang de protéines de la phase aiguë comme la sérum amyloïde A (SAA) et la protéine C réactive (CRP). L'ensemble de ces modifications indique potentiellement une hépatotoxicité causée par la tempête cytokinique induite par l'infection par le SARS-CoV-2 (**Huang et al. 2020a, c**).

Au cours de notre première partie, nous avons montré une modification de l'apolipoprotéome des malades, pouvant refléter une modification qualitative et quantitative des lipoprotéines, en particulier les HDL et les LDL.

Nous avons déjà détaillé dans la synthèse bibliographique, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des HDL ainsi que la composition de leur protéome.

En ce qui concerne, l'autre classe de lipoprotéines la plus impactée en situation inflammatoire, les LDL, celle-ci a pour fonction le transport du cholestérol du foie vers les tissus périphériques. Ces lipoprotéines sont particulièrement responsables du développement des maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose (**Gofman et al. 1954; Newman et al. 1986; Goldstein and Brown 2015**). Elles sont les derniers produits de délipidation des VLDL dont l'altération du métabolisme impacte la structure et les fonctions des LDL (**Feingold 2000; Ginsberg et al. 2021**). Les LDL présentent de l'Apo B100 en apolipoprotéine majoritaire (95%), mais elles transportent aussi d'autres apolipoprotéines et protéines telles que PON-1 qui leur confèrent ainsi diverses fonctions (**Karlsson et al. 2005b; Dashty et al. 2014**). Dans la circulation sanguine, ces lipoprotéines possèdent aussi une hétérogénéité structurale comme les HDL. En effet, chez une personne saine, on retrouve

trois classes de LDL : les LDL-I grosses et flottantes ( $d=1,019-1,023$ ), les LDL-II de taille et densité intermédiaires ( $d=1,063-1,034$ ) et les LDL-III petites et denses ( $d=1,034-1,044$ ). Une quatrième sous fractions est présente uniquement chez les patients présentant une hypertriglycéridémie, ce sont les LDL-IV très petites et plus denses ( $d=1,044-1,063$ ) (Krauss and Burke 1982; Austin et al. 1990). D'après la formule de Friedwald, la concentration en LDL-C mesurée en routine correspond à la différence entre le cholestérol total et le HDL-C, ajustée en soustrayant un cinquième des triglycérides (Li et al. 1994). Une prédominance de LDL petites et denses (sdLDL) augmente le risque d'avoir une maladie cardiovasculaire (Rizzo et al. 2009). Les patients infectés par des bactéries du genre *Leptospira* présentent une concentration en LDL-C diminuée mais une prédominance de LDL petites et denses (Gazi et al. 2011). Ces LDL petites et denses sont d'ailleurs davantage sujettes à l'oxydation et au phénomène de glycation (Chancharme et al. 1999; Younis et al. 2009). Jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées aux différentes sous-fractions de LDL au cours d'un sepsis viral comme la COVID-19 sévère.

Dans cette deuxième partie, j'ai évalué les modifications structurales et de composition des lipoprotéines à ApoB100 mais aussi, et de manière plus détaillée, les altérations des HDL isolées en situation de COVID-19

Un grand nombre d'études a mis en évidence les modifications quantitatives de ces lipoprotéines (HDL et LDL), ainsi que leur association avec la sévérité et la mortalité des patients atteints de COVID-19. Cependant, peu d'études se sont intéressées à leur composition et à leur fonction durant l'infection par le SARS-CoV-2.

Par conséquent, pour cette seconde partie, je me suis attaché à étudier l'impact de la COVID-19 sur la structure et la composition des lipoprotéines à ApoB100 et des HDL. Un focus particulier a été mis sur les HDL, pour lesquelles en plus de leur protéome et taille, nous avons testé leur fonctionnalité in vitro après isolement de patient COVID-19 vs sujets sains.

Cette partie se décline en trois études sur les lipoprotéines purifiées d'échantillons de plasma provenant de différentes collections biologiques.

La **première étude** vise à caractériser la composition des HDL et leur fonctionnalité chez des patients en situation de COVID-19 sévère. Afin de répondre à cet objectif, les HDL de ces patients et des sujets sains ont été isolées à partir de plasma par ultracentrifugation séquentielle de flottaison. Les plasmas de patients atteints de COVID-19 proviennent de la

collection biologique *Aposize*. Ces patients ont été admis dans l'étude suite à la manifestation d'un sepsis due à une pneumonie COVID-19, au cours du premier pic d'épidémie de COVID-19 en 2020, au sein du service de réanimation de l'hôpital universitaire Bichat Claude-Bernard à Paris, sous l'impulsion de notre laboratoire (Dr Sébastien Tanaka). Les échantillons plasmatiques ont été prélevés dès leur arrivée en service de réanimation, et également trois jours et une semaine après leur admission.

Les HDL des sujets contrôles (sains) qui ont été isolées, proviennent quant à elles, d'une collection biologique de plasmas de personnels soignants volontaires du CHU de La Réunion. Les patients COVID-19 ont été appariés par âge et sexe aux sujets contrôles. Lors cette étude, j'ai réalisé l'ensemble des analyses protéomique des HDL suite leur isolement par une méthode d'ultracentrifugation réalisée en deux étapes. J'ai participé à la mise en place du protocole de « *shotgun* » protéomique des HDL avec le Dr Bryan Veeren et j'ai également réalisé l'ensemble des analyses bio-informatique et statistique de la protéomique des HDL. En ce qui concerne les expériences *in cellulo*, j'ai réalisé les expériences de costimulation des cellules endothéliales (HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) au moyen d'un impédancemètre cellulaire. Dans ces expériences, les cellules endothéliales ont été co-stimulées avec du TNF $\alpha$  et les HDL des sujets contrôles ou des patients COVID-19. Les autres expériences *in vitro* ont été réalisées par les co-auteurs de l'article.

La **seconde étude** s'est focalisée sur la caractérisation des LDL en particulier sur ses sous-populations dans le plasma ainsi que sur la composition protéique. Pour cela, la fraction en apoB (d<1,063) a été isolée par ultracentrifugation à partir des plasmas de patients COVID-19 et de sujets contrôles qui ont été appariés par âge et sexe. L'analyse des sous-populations de LDL a été réalisée à l'aide de la technique de séparation par électrophorèse non dénaturante en gel de polyacrylamide en tube ou Lipoprint LDL.

Afin de répondre à cet objectif, les plasmas de patients présentant une COVID-19 sévère ont été analysés. Ces plasmas proviennent de l'étude LIPICOR « LIPId profile changes in INflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2 » (ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT05113836) qui est une étude monocentrique menée dans le service de réanimation chirurgicale de l'hôpital universitaire Bichat Claude-Bernard, Paris, France. Les patients ont été recrutés de novembre 2020 à mars 2021 et les sujets sains contrôles sont des personnels soignants volontaires du Centre Hospitalier Universitaire de La Réunion (étude H-COV-RUN, ClinicalTrials.gov Identifiant : NCT04384705).



La **troisième étude** est dans la continuité de la première partie sur l'apolipoprotéome dans le plasma et de la première étude de cette partie sur la caractérisation des HDL chez les patients COVID-19. Cette étude vise, tout d'abord à comparer les concentrations en apolipoprotéines plasmatiques des patients décédés à celles des patients survivants. Le second objectif de cette étude est de caractériser la taille et le protéome des HDL des patients en fonction du devenir de leur maladie (décès et guérison).

Afin de répondre à cet objectif, nous disposons des plasmas provenant d'une cohorte prospective française de la COVID-19 (NCT04262921) dans laquelle les patients COVID-19 avaient été recrutés du 1<sup>er</sup> février 2020 au 31 juillet 2020 lors de leur admission en service de réanimation. Les patients de cette étude répondent aux critères suivants : être hospitalisés en réanimation, ne pas être sous traitement hypolipémiant et nous permettant l'accès à suffisamment de plasma pour l'ensemble des analyses.

L'analyse des sous-populations de HDL a été également réalisée par la technique de Lipoprint HDL. Comme au cours de la première partie, l'apolipoprotéome a été quantifié par spectrométrie de masse directement sur le plasma des patients. Puis, les lipoprotéines ont été isolées par une méthode d'isolement par ultracentrifugation qui a été améliorée par rapport à celle utilisée dans la cohorte *Aposize*. L'ultracentrifugation a été réalisée, ici, en trois étapes afin d'isoler les différentes sous-classes de lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL). L'étape supplémentaire est la purification des HDL isolées par ultracentrifugation par la FPLC visant à éliminer la contamination en albumine associée aux particules de HDL en sortie d'ultracentrifugation. Concernant, l'analyse « *shotgun* » protéomique, la préparation des échantillons a aussi été optimisée avec l'ajout d'une étape de dénaturation par l'ajout d'urée et d'une étape de dénaturation thermique. La dénaturation par l'urée des HDL permet de quantifier et identifier un maximum de peptides rentrant dans la composition des protéines de ces nanoparticules. Les autres étapes de préparation des échantillons destinés à l'analyse protéomique n'ont pas été modifiées.

## B. Résultats

Les résultats de cette partie ont été valorisés sous forme de trois articles scientifiques :

- Le premier article est intitulé « **Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19** » publiée dans le journal *Scientific Reports* en 2021.
- Le deuxième article est soumis dans "*Virology Journal*" et intitulé « **Atherogenic lipoprotein modifications during severe COVID-19** ».
- Le troisième article est en cours de soumission et s'intitule « **HDL proteome and apolipoprotein concentrations in severe ICU COVID-19 patients** ».



# Article 2

*Scientific reports.* 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-81638-1

## **Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19**

**Floran BEGUE**, Sébastien TANAKA, Zarouki MOUKTADI, Philippe RONDEAU, Bryan VEEREN, Nicolas DIOTEL, Alexy TRAN-DINH, Tiphaine ROBERT, Erick VÉLIA, Patrick MAVINGUI, Marie LAGRANGE-XÉLOT, Philippe MONTRAVERS, David COURET & Olivier MEILHAC





OPEN

## Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19

Floran Begue<sup>1</sup>, Sébastien Tanaka<sup>1,2</sup>, Zarouki Mouktadi<sup>1</sup>, Philippe Rondeau<sup>1</sup>, Bryan Veeren<sup>1</sup>, Nicolas Diotel<sup>1</sup>, Alexy Tran-Dinh<sup>2,3</sup>, Tiphaine Robert<sup>4</sup>, Erick Vélia<sup>5</sup>, Patrick Mavingui<sup>6</sup>, Marie Lagrange-Xélot<sup>7</sup>, Philippe Montravers<sup>2,3,8</sup>, David Couret<sup>1,9,11</sup> & Olivier Meilhac<sup>1,10,11</sup>✉

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is affecting millions of patients worldwide. The consequences of initial exposure to SARS-CoV-2 go beyond pulmonary damage, with a particular impact on lipid metabolism. Decreased levels in HDL-C were reported in COVID-19 patients. Since HDL particles display antioxidant, anti-inflammatory and potential anti-infectious properties, we aimed at characterizing HDL proteome and functionality during COVID-19 relative to healthy subjects. HDLs were isolated from plasma of 8 severe COVID-19 patients sampled at admission to intensive care unit (Day 1, D1) at D3 and D7, and from 16 sex- and age-matched healthy subjects. Proteomic analysis was performed by LC-MS/MS. The relative amounts of proteins identified in HDLs were compared between COVID-19 and controls. apolipoprotein A-I and paraoxonase 1 were confirmed by Western-blot analysis to be less abundant in COVID-19 versus controls, whereas serum amyloid A and alpha-1 antitrypsin were higher. HDLs from patients were less protective in endothelial cells stimulated by TNF $\alpha$  (permeability, VE-cadherin disorganization and apoptosis). In these conditions, HDL inhibition of apoptosis was blunted in COVID-19 relative to controls. In conclusion, we show major changes in HDL proteome and decreased functionality in severe COVID-19 patients.

Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is causing a major worldwide pandemic associated with respiratory symptoms characterized by acute lung injury, and rapidly progressing to acute respiratory distress syndrome (ARDS). Lung dysfunction is rapidly paralleled by an important “cytokine storm” in which inflammatory cytokines are abundantly released into the blood stream by immune and non-immune cells, leading to host tissue damage<sup>1</sup>. Several studies reported important modifications in the lipid profile of COVID-19 patients. In a small cohort of patients, Fan et al. suggested that decreased low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) concentration could be a predictor of poor prognosis. In non-survivor patients (n = 4) they report that LDL-C levels decreased continuously until death and inversely correlated with high-sensitivity C-reactive protein (CRP) levels<sup>2</sup>. Wang et al. reported positive correlations between COVID-19 severity and several biochemical markers including serum amyloid A (SAA), CRP or procalcitonin and negative correlation with albumin and HDL-C<sup>3</sup>. Another study suggested that COVID-19 patients (n = 114) presented a marked decrease in both LDL-C and HDL-C, the latter being associated with the severity of the disease<sup>4</sup>. We recently reported that LDL-C concentrations in COVID-19 patients were associated with mortality in case of bacterial superinfection during ICU hospitalization<sup>5</sup>. The dramatic decrease in albumin and lipoproteins as well as the release of acute phase proteins (SAA, CRP and lactate dehydrogenase) support the hypothesis that these parameters may represent surrogate markers of hepatic dysfunction and hepatotoxicity caused by COVID-19-induced cytokine storm<sup>6</sup>. HDL particles display pleiotropic effects, in addition to their well-known reverse transport cholesterol

<sup>1</sup>INSERM, UMR 1188 Diabète atherothrombose Réunion Océan Indien (DéTROI), Université de La Réunion, Saint-Denis de La Réunion, France. <sup>2</sup>AP-HP, Service d'Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France. <sup>3</sup>Université de Paris, UFR Denis Diderot, Paris, France. <sup>4</sup>AP-HP, Service de Biochimie, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France. <sup>5</sup>Clinique Sainte-Clotilde, Groupe Clinifutur, Pôle mère enfant, 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France. <sup>6</sup>UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Université de La Réunion, 2 rue Maxime Rivière (GIP CYROI), 97490 Sainte-Clotilde, La Réunion, France. <sup>7</sup>Service des maladies infectieuses, CHU de La Réunion, Saint-Denis, France. <sup>8</sup>Inserm UMR 1152 Physiopathologie Et Épidémiologie Des Maladies Respiratoires, Université Diderot, Paris, France. <sup>9</sup>Service de neuro-réanimation, CHU de La Réunion, Saint-Pierre, France. <sup>10</sup>CIC-EC 1410, CHU de La Réunion, Saint-Pierre, France. <sup>11</sup>These authors contributed equally: David Couret and Olivier Meilhac. ✉email: olivier.meilhac@inserm.fr

Characteristics	ICU COVID-19 (n = 8)	Controls (n = 16)
Age, years, median [IQR]	51 [46–62]	50.5 [46–57]
Male sex, n (%)	5 (63)	9 (56)
BMI, kg/m <sup>2</sup> , median [IQR]	29 [23–31]	23.5 [22–26]
<b>Presence of comorbidities</b>		
High blood pressure, n (%)	1 (12.5)	2 (12.5)
Diabetes mellitus, n (%)	1 (12.5)	0 (0)
Statin use, n (%)	1 (12.5)	0 (0)
<b>Timing of hospitalization</b>		
Between first symptoms and hospitalization (days)	8 [2–11]	
Between hospitalization and ICU admission (days)	3 [2–5]	
<b>Severity scores at admission</b>		
SAPSII, median [IQR]	44 [41–56]	
SOFA, median [IQR]	6 [5–7]	
<b>Treatments during ICU stay</b>		
Norepinephrine, n (%)	6 (75)	
Mechanical ventilation, n (%)	8 (100)	
Length of mechanical ventilation, median [IQR]	11 [6–31]	
Prone positioning, n (%)	4 (50)	
Tracheostomy, n (%)	1 (12.5)	
ECMO, n (%)	2 (25)	
RRT, n (%)	1 (12.5)	
<b>COVID specific treatments</b>		
Lopinavir/ritonavir, n (%)	0 (0)	
Hydroxychloroquine, n (%)	2 (25)	
Corticosteroids, n (%)	2 (25)	
<b>Outcome</b>		
ICU LOS, median [IQR]	16 [6–32]	
Hospital LOS, median [IQR]	22 [10–39]	
Mortality at day-28, n (%)	3 (37.5)	

**Table 1.** General characteristics and outcome of ICU COVID-19 patients and control subjects. BMI, body mass index; ECMO, extracorporeal membrane oxygenation; LOS, length of stay; RRT, renal replacement therapy; SAPS II, simplified acute physiology score II.

function from peripheral tissues back to the liver, such as antioxidant, anti-inflammatory and even anti-infectious properties<sup>7,8</sup>. Beyond the quantitative aspect, nothing has been reported yet regarding the structure, composition, and functionality of HDL particles in COVID-19. Impaired HDL function may participate in endothelial loss of integrity, increased oxidative stress and inflammation which aggravates the pathophysiology of COVID-19, characterized by a severe endothelial injury associated with the presence of intracellular virus<sup>9</sup>. HDL particles are profoundly altered in low-grade and acute inflammation<sup>10–12</sup>. HDL modifications may affect their protein cargo and their lipid content, producing "pro-inflammatory HDL particles"<sup>13,14</sup>. These particles, in addition to losing their endothelial protective effects, may induce monocyte/macrophage production of TNF $\alpha$  and MCP-1<sup>15</sup>. Whereas modifications of HDL-C levels, particle size and function are well documented in bacterial sepsis, only scarce information is available for viral infection<sup>12,16</sup>. The aim of the present study was to characterize HDL protein composition and functionality in severe COVID-19. For this purpose, HDLs were isolated by ultracentrifugation from plasma of severe COVID-19 patients the day of their admission to the intensive care unit (ICU) (D1), at D3 and D7 for survivors. Shotgun proteomics was performed on HDL fractions and their endothelial protective effect was tested on HUVECs (human umbilical vein endothelial cells).

## Results

**Characteristics of the study population.** The main characteristics of COVID-19 cases and controls included in the study are detailed in Table 1. No significant difference was observed regarding age, gender and BMI between COVID-19 patients and controls. Controls were matched for age and gender (2 controls /patient). Severe COVID-19 patients have a median age of 51 [46–62] years old and male represent 63% of the population. Among COVID-19 patients, 12.5% had prior high blood pressure, 12.5% had a diabetes mellitus and 12.5% use statins. At admission, SAPSII and SOFA scores were 44 [41–56] and 6 [5–7], respectively. During their ICU stay, 75% were in septic shock, 25% in sepsis; all patients required mechanical ventilation with a median length of mechanical ventilation of 11 [6–31] days. 50% of patients needed prone positioning and 25% assistance by

Lipid profile	Admission (D1)	Day 3	Day 7	Controls	<i>p</i> values (D1 vs Controls)
TC, mmol/L, median [IQR]	2.65 [2.46–3.88]	2.68 [2.30–3.24]	4.09 [3.21–4.89]	5.25 [4.83–5.73]	0.0016
TG, mmol/L, median [IQR]	2.53 [1.73–2.99]	2.73 [2.0–3.18]	2.11 [2.02–3.60]	1.20 [0.90–1.83]	0.0152
HDL-C, mmol/L, median [IQR]	0.77 [0.49–0.83]	0.58 [0.44–0.86]	0.84 [0.64–0.91]	1.46 [1.34–1.69]	<0.0001
LDL-C, mmol/L, median [IQR]	1.43 [1.28–2.20]	1.55 [1.13–2.0]	0.96 [0.90–2.19]	3.20 [2.15–3.65]	0.0081
Apo-AI, mg/dL, median [IQR]	48.3 [18.8–53.2]	45.1 [18.6–56.9]	56.9 [48.2–61.6]	92.8 [84.9–103.9]	<0.0001

**Table 2.** Lipid profile and plasma ApoA-I concentration in COVID patients and control subjects. Mann–Whitney test was performed to compare the lipid profiles of controls (n = 16) versus COVID-19 at admission (n = 8) patients. TC, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-C, High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, Low-density lipoprotein cholesterol.

ECMO. Renal replacement therapy was necessary for 12.5% of patients. Day-28 mortality was 37.5% whereas ICU and hospital length of stay were 16 [6–32] and 22 [10–39] days respectively.

Lipid profiles were significantly affected by COVID-19 with decreased total cholesterol, HDL-C and LDL-C levels and increased triglyceride concentration at admission (D1) relative to control subjects (Table 2). Plasma ApoA-I quantified by mass spectrometry was decreased by 55% in patients versus controls. A good correlation was observed between ApoA-I and HDL-C levels ( $r = 0.94$ ,  $p < 0.0001$ , Supplemental Figure 1).

**Shotgun proteomics comparing HDLs from COVID-19 versus controls.** Trypsin digestion was performed on 3  $\mu$ g total proteins and the resulting peptides were desalted and subsequently analyzed by LC-MS/MS as described in the “Methods” section. The following criteria were used in order to identify HDL-associated proteins in all samples (D1 COVID-19 and control HDL samples):  $q$ -values  $\leq 0.01$ , unique peptides  $\geq 2$  and  $X_{corr} \geq 2$ . MS/MS spectra were searched against Uniprot Human database, using the Sequest HT search engine. For proteins with unique peptide below two, MS/MS spectra were manually inspected. Detailed information is given in the Supplementary Table 1. A total of 35 samples were analyzed from 8 COVID-19 patients at Day 1 and D3, 4 samples at D7 (n = 20 for COVID-19) and 15 controls. Shotgun proteomics allowed automated identification of 83 proteins in D1 COVID-19+ and control HDL samples (Supplementary Table 1). Among them, 32 proteins met the above-mentioned criteria allowing a high degree of confidence for identification (Table 3). All these proteins have already been previously found associated with HDL fractions using proteomic approaches<sup>17,18</sup>. We identified 5 proteins that were significantly more abundant in HDLs from COVID-19 patients, namely serum amyloid A-1 and 2 (SAA-1, 2), alpha-1 anti-trypsin (AAT), fibrinogen beta chain and alpha-1 acid glycoprotein. Conversely, 19 proteins were less abundant in COVID-19 versus control HDLs. In addition to ApoA-I, most of the apolipoproteins classically associated with HDLs were less abundant in COVID-19 HDL particles, including ApoA-II, ApoC-I, II, III, IV, ApoA-IV, ApoC-I, ApoJ, Apo(a), ApoE, ApoM, ApoD, ApoB100 and ApoF. Other proteins were also less abundant in HDLs from COVID-19 patients such as paraoxonases 1 and 3 (PON-1 and 3) (Table 3, Figs. 1 and 2). None of the proteins identified in HDLs were differential between D1 and D7 nor correlated with subsequent mortality (4 survivors vs 4 non-survivors, Supplementary Table 2). However, 6 proteins were significantly correlated with SAPSII, 5 of which were negatively correlated with severity (phospholipid transfer protein (PLTP), ApoAI, ApoAII, Serum Paraoxonase 3 and serum amyloid A1), whereas apo(a) was positively correlated with severity (Supplementary Figure 2).

Western-blot analysis was performed on selected proteins in order to confirm mass spectrometry identification and abundance comparison between COVID-19 and control conditions: SAA-1, PON-1 (Fig. 3A,B) and AAT (Supplemental Figure 3). SAA-1 was abundantly associated with HDLs isolated from COVID-19 patients relative to that of controls. No trend was observed for SAA-1 abundance according to the number of days post-admission (D1, 3 and 7) and whether patients survived (C3+, C4+, C5+, C6+) or not (C1+, C2+, C7+, C8+). PON-1 is known to be mainly transported by HDLs but can also bind to LDLs. We tested the presence of PON-1 by western-blot in LDL and HDL fractions from a pool of controls, severe COVID-19+ ICU patients (C+) and seropositive cured caregivers who did not need to be admitted in ICU (n = 4, Sero+). PON-1 is markedly less associated with HDLs from severe C+ ICU patients, thus confirming mass spectrometry results, whereas LDL-associated PON-1 was rather constant in all three groups (Fig. 3B). Since neutrophils are activated in COVID-19 and able to release proteases such as elastase, in association with a pro-thrombotic state involving the fibrinolytic system<sup>19</sup>, we tested the hypothesis that elastase and plasmin could degrade HDL-associated PON-1. Both proteases, alone or in combination were able to proteolyse PON-1 associated with HDLs from a pool of controls (n = 16) (Fig. 3B, right panel).

**Anti-inflammatory effects of HDLs on TNF $\alpha$ -stimulated human umbilical vein endothelial cells.** Beyond their function as reverse transporter of cholesterol from peripheral tissues back to the liver, HDLs display endothelial protective properties<sup>8</sup>. We tested the anti-inflammatory effects of HDLs from patients or healthy subjects on HUVECs stimulated by TNF $\alpha$ . After 6 h serum deprivation allowing a better uptake of HDLs, HUVECs were incubated with 30 ng/mL of TNF $\alpha$  and the impedance was monitored for 36 h. Changes in cell index reflecting cell retraction and loss in cell–cell junctions was plotted over time as shown in Fig. 4. TNF $\alpha$ -induced decrease in cell index was prevented by co-incubation with HDLs from healthy subjects whereas HDLs isolated from COVID-19 patients displayed a reduced protective effect (% of HDL protection relative



Accession	Protein names	Coverage [%]	# PSMs <sup>a</sup>	Unique Peptides <sup>b</sup>	% patients with protein identified (D1) <sup>c</sup>	Q Peptides <sup>d</sup>
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	9	6	1	100	1
P19652	Alpha-1-acid glycoprotein 2	17	8	2	87.5	3
P01009	Alpha-1-antitrypsin	49	76	16	100	16
P02647	Apolipoprotein A-I	93	2167	54	100	54
P02652	Apolipoprotein A-II	77	348	15	100	15
P06727	Apolipoprotein A-IV	32	76	14	62.5	14
P04114	Apolipoprotein B-100	12	123	44	100	44
P02654	Apolipoprotein C-I	29	47	5	87.5	5
P02655	Apolipoprotein C-II	59	93	8	100	8
P02656	Apolipoprotein C-III	43	201	6	100	6
P55056	Apolipoprotein C-IV	29	10	3	37.5	3
P05090	Apolipoprotein D	42	649	14	100	14
P02649	Apolipoprotein E	78	335	28	100	28
Q13790	Apolipoprotein F	8	21	2	87.5	2
O14791	Apolipoprotein L1	34	108	13	87.5	13
O95445	Apolipoprotein M	53	203	14	100	14
P08519	Apolipoprotein(a)	47	82	29	87.5	29
P02749	Beta-2-glycoprotein 1	4	3	1	25.00	1
P16070	CD44 antigen	3	3	2	37.5	2
P10909	Clusterin (Apo J)	24	36	9	50.00	9
P02671	Fibrinogen alpha chain	20	94	12	100	12
P02675	Fibrinogen beta chain	4	14	3	87.5	3
P00738	Haptoglobin	21	22	2	62.5	2
P55058	Phospholipid transfer protein	11	30	4	75	4
P05109	Protein S100-A8	13	2	2	62.5	2
P07988	Pulmonary surfactant-associated protein B	5	5	2	50	2
P0DJ18	Serum amyloid A-1 protein	75	1114	8	100	14
P0DJ19	Serum amyloid A-2 protein	75	433	7	100	7
P35542	Serum amyloid A-4 protein	62	667	10	100	10
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	52	107	9	87.5	10
Q15166	Serum paraoxonase/lactonase 3	21	14	4	62.5	4
P02766	Transthyretin	33	9	3	37.5	3
Accession	Protein Abundance <sup>e</sup> (PA) (Control)	Protein Abundance <sup>e</sup> (PA) (D1 COVID)	Abundance ratio <sup>f</sup> D1 COVID/Control	Log (2) Abundance ratio (D1 COVID/Control)	p values <sup>g</sup>	Variation (D1COVID vs Control)
P02763	1.28E+04 ± 8.92E+03	5.65E+04 ± 4.08E+04	4.41	2.14	0.0266*	↑
P19652	4.56E+04 ± 5.79E+04	4.80E+04 ± 4.43E+04	1.05	0.07	0.6355 <sup>ns</sup>	-
P01009	1.55E+06 ± 5.98E+05	2.78E+06 ± 1.43E+06	1.80	0.85	0.0473*	↑
P02647	6.20E+08 ± 3.42E+08	8.91E+07 ± 5.49E+07	0.14	-2.80	0.0003***	↓
P02652	1.72E+08 ± 8.17E+07	2.40E+07 ± 1.55E+07	0.14	-2.84	0.0003***	↓
P06727	1.55E+06 ± 9.17E+05	5.28E+04 ± 3.87E+04	0.03	-4.88	0.0025**	↓
P04114	2.22E+06 ± 1.77E+06	1.45E+06 ± 3.57E+06	0.65	-0.62	0.0235*	↓
P02654	3.94E+06 ± 3.29E+06	1.06E+05 ± 1.56E+05	0.03	-5.22	<0.0001****	↓
P02655	1.02E+07 ± 8.85E+06	8.27E+05 ± 5.47E+05	0.08	-3.62	0.0004***	↓
P02656	7.83E+07 ± 4.66E+07	6.82E+06 ± 4.59E+06	0.09	-3.52	0.0002***	↓
P55056	2.30E+05 ± 1.96E+05	1.45E+04 ± 6.42E+03	0.06	-3.99	0.0055**	↓
P05090	1.15E+08 ± 5.03E+07	2.71E+07 ± 1.47E+07	0.24	-2.09	0.0003***	↓
P02649	3.44E+07 ± 2.09E+07	5.44E+06 ± 3.51E+06	0.16	-2.66	0.0002***	↓
Q13790	3.39E+06 ± 1.78E+06	9.98E+05 ± 6.12E+05	0.29	-1.76	0.0004***	↓
O14791	4.78E+06 ± 3.13E+06	2.87E+06 ± 1.80E+06	0.60	-0.74	0.0755 <sup>ns</sup>	-
O95445	4.61E+07 ± 2.25E+07	5.87E+06 ± 4.64E+06	0.13	-2.97	<0.0001****	↓
P08519	3.53E+06 ± 4.89E+06	5.65E+04 ± 5.42E+04	0.02	-5.96	0.0262*	↓
P02749	2.38E+04 ± 1.35E+04	6.18E+03 ± 2.95E+03	0.26	-1.94	0.0762 <sup>ns</sup>	-

Continued

Accession	Protein Abundance <sup>c</sup> (PA) (Control)	Protein Abundance <sup>c</sup> (PA) (D1 COVID)	Abundance ratio <sup>f</sup> D1 COVID/Control	Log (2) Abundance ratio (D1 COVID/Control)	<i>p</i> values <sup>g</sup>	Variation (D1 COVID vs Control)
P16070	5.08E+04 ± 4.90E+04	3.27E+03 ± 2.78E+03	0.06	-3.96	0.011*	↓
P10909	1.05E+06 ± 6.40E+05	8.89E+04 ± 6.64E+04	0.08	-3.57	0.0062**	↓
P02671	1.83E+06 ± 1.18E+06	1.27E+06 ± 8.80E+05	0.69	-0.53	0.2651 <sup>ns</sup>	-
P02675	7.19E+04 ± 4.66E+04	1.39E+05 ± 9.18E+04	1.93	0.95	0.2382 <sup>ns</sup>	-
P00738	1.30E+05 ± 1.22E+05	3.29E+04 ± 3.32E+04	0.25	-1.98	0.1068 <sup>ns</sup>	-
P55058	6.97E+05 ± 4.31E+05	1.07E+05 ± 8.26E+04	0.15	-2.70	0.0016**	↓
P05109	1.48E+04 ± 6.13E+03	1.64E+05 ± 3.32E+05	11.08	3.47	0.6905 <sup>ns</sup>	-
P07988	5.13E+04 ± 4.88E+04	2.18E+05 ± 3.42E+05	4.25	2.09	0.5459 <sup>ns</sup>	-
P0DJ18	9.86E+06 ± 7.51E+06	6.92E+08 ± 3.61E+08	70.16	6.13	<0.0001****	↑
P0DJ19	5.51E+05 ± 7.45E+05	8.73E+07 ± 5.81E+07	158.33	7.31	<0.0001****	↑
P35542	7.17E+07 ± 3.45E+07	6.22E+07 ± 4.80E+07	0.87	-0.20	0.3572 ns	-
P27169	3.27E+06 ± 1.93E+06	9.69E+05 ± 7.33E+05	0.30	-1.75	0.001**	↓
Q15166	2.12E+05 ± 1.27E+05	2.78E+04 ± 1.36E+04	0.13	-2.93	0.0002***	↓
P02766	1.74E+05 ± 1.05E+05	4.56E+04 ± 2.99E+04	0.26	-1.93	0.0324*	↓

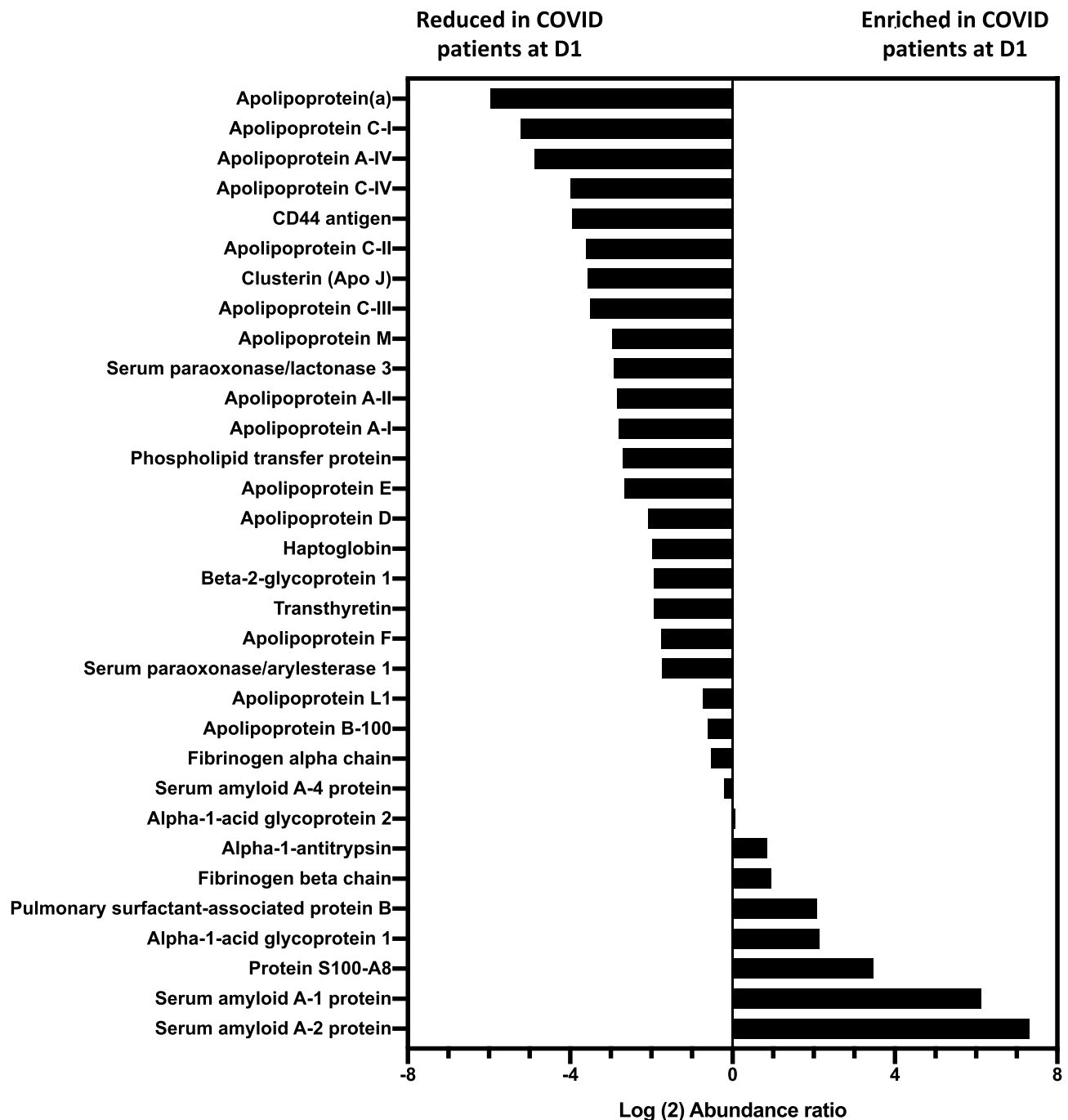
**Table 3.** List of proteins identified in D1 COVID-19+ and control HDL samples. HDL were isolated from the plasma of 15 control and 8 D1 COVID-19 subjects by ultracentrifugation. MS/MS spectra were searched against Uniprot Human database, using the Sequest HT search engine. All protein identification and quantification was performed with *q*-values ≤ 0.01, unique peptides ≥ 2 and a Xcorr ≥ 2. For protein with unique peptide below two, MS/MS spectrum was manually inspected. <sup>a</sup>PSM's is the total number of identified peptide spectra matched for protein. <sup>b</sup>Unique peptide to a protein identified from all samples in the analysis. <sup>c</sup>% of patients for whom this protein has been identified at Day 1. <sup>d</sup>Q peptide is the number of peptide used for the quantification. <sup>e</sup>Protein abundance is the mean of total peptide intensities for each group. <sup>f</sup>Abundance ratio is the ratio of the D1 COVID and Control protein abundances. <sup>g</sup>*p* values were obtained by Mann–Whitney test. \**p* < 0.0332, \*\**p* < 0.0021, \*\*\**p* < 0.0002 and \*\*\*\**p* < 0.0001 as compared to the control group.

to TNFα expressed as median [Q1;Q3]: 24.50 [18.03;32.34] versus 17.07 [14.98;27.97] respectively in controls and COVID-19 patients, *p* = 0.0234, supplementary Fig. 4A). Figure 4 shows representative cell index curves of endothelial cells stimulated by TNFα alone and in the presence of pooled HDLs (n = 16 controls and n = 8 COVID-19). In the COVID-19 group, a trend towards a better protection of HDLs from survivors relative to non-survivor patients was observed (*p* = 0.057, Supplemental Figure 4B).

**Blunted anti-apoptotic effects of HDLs from COVID-19 patients in HUVECs stimulated by TNFα.** In addition, to prevent endothelial barrier permeability, HDLs are able to counteract apoptosis induced by TNFα<sup>20</sup>. After 36 h stimulation with TNFα, 37% of endothelial cells displayed characteristic apoptotic nuclear condensation and/or fragmentation<sup>21</sup>, as shown in Fig. 5 (plain white arrowheads) and Fig. 6 by TUNEL. A good correspondence was observed between nuclear changes quantified after DAPI staining and TUNEL (Fig. 6). HDLs from healthy subjects prevented apoptosis by 40% (reducing the % of apoptotic cells to 22%), whereas HDLs from patients were not able to thwart TNFα-induced apoptosis. In controls, the number of apoptotic nuclei corresponds to 11%, probably due to serum deprivation. Given that VE cadherin plays a key role in endothelial cell survival<sup>22</sup>, VE-cadherin immunostaining was performed (Fig. 5) and showed that TNFα induced a significant disorganization of cell–cell junctions characterized by a redistribution of VE-cadherin into the cytoplasm (empty white arrowheads). This disruption of cell–cell interactions by TNFα was, at least partially, prevented by co-incubation with HDLs isolated from non-COVID-19 subjects (HDL-) whereas HDL from COVID-19+ patients (HDL+) had no protective effect.

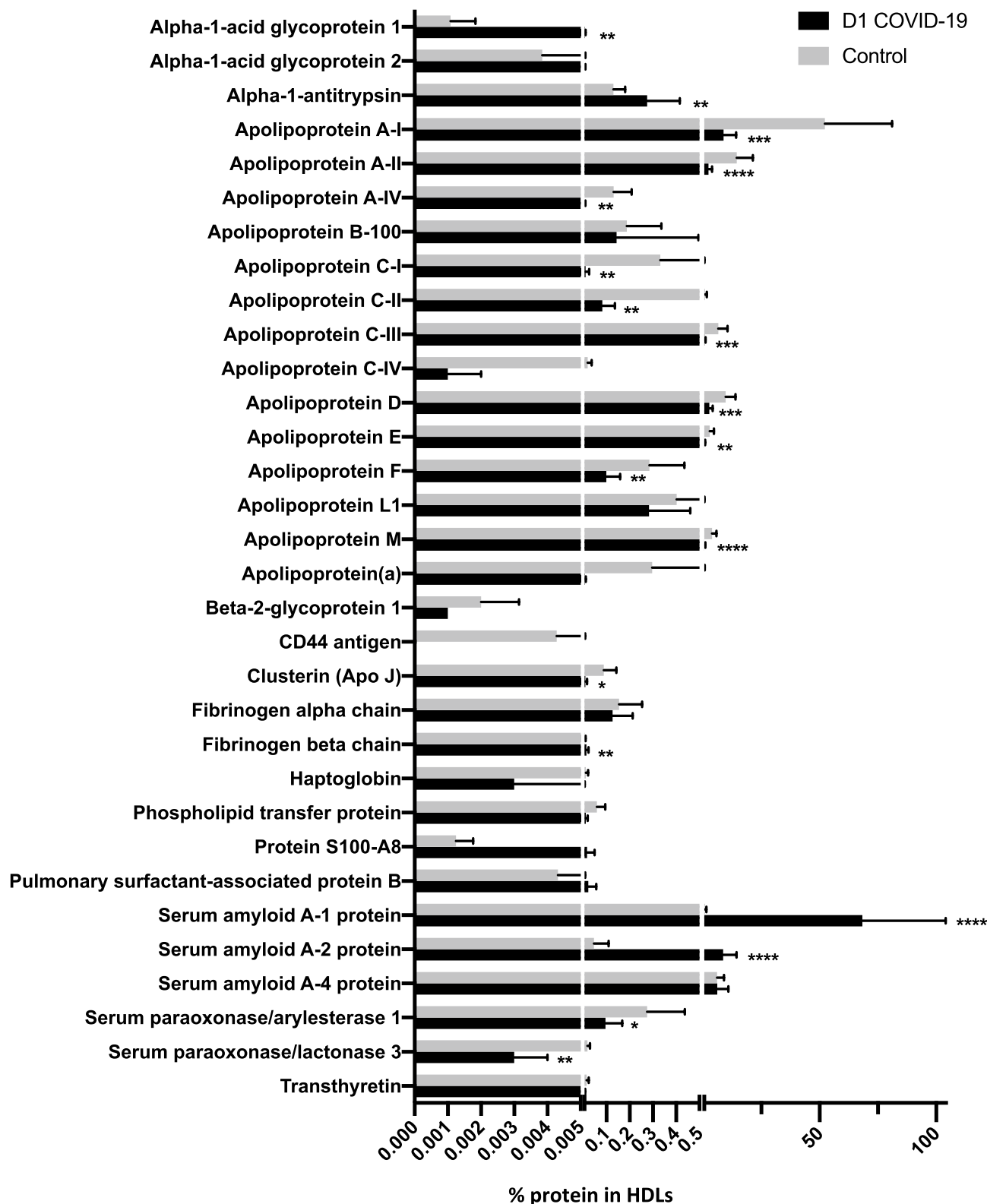
## Discussion

COVID-19 has emerged as a real threat to public health, characterized by damage to the respiratory tract, followed by an uncontrolled inflammatory response that can lead to organ failure and death<sup>23</sup>. A major impact of COVID-19 on the main metabolic parameters, and in particular on the lipid profile, has been reported by several authors, resulting mainly in a very significant drop in total cholesterol, LDL-C and HDL-C levels<sup>2,4,6,24</sup>. In the present study, we also observed very low HDL-C levels in patients as compared to controls and to normal values, whereas triglyceride concentration was doubled in COVID-19 patients. The prolonged use of Propofol (> 3 days) is reported to increase triglyceride levels in ICU patients<sup>25</sup> and thus should not be the cause of the elevated levels observed at D1 in our study. Decreased levels of total cholesterol and cholesterol-transporting lipoproteins have been reported for a long time in ICU patients, particularly in bacterial sepsis, in which HDL particles may participate in lipopolysaccharide clearance<sup>7,26</sup>. In viral sepsis, the situation is less clear-cut even if lipid profile disorders have been reported in Dengue, HIV or Hepatitis infections<sup>27–29</sup>. A recent study in COVID-19 patients reports reduced plasma ApoA-I, ApoA-II and Apo-B levels as well as decreased LDL particle number and HDL subfractions assessed by nuclear magnetic resonance<sup>30</sup>. They also report increased LDL triglycerides and of VLDL parameters (particle number, free cholesterol and triglycerides) in these patients. Decreased HDL-C was also recently reported to be associated with the severity of COVID-19<sup>4,31</sup>.

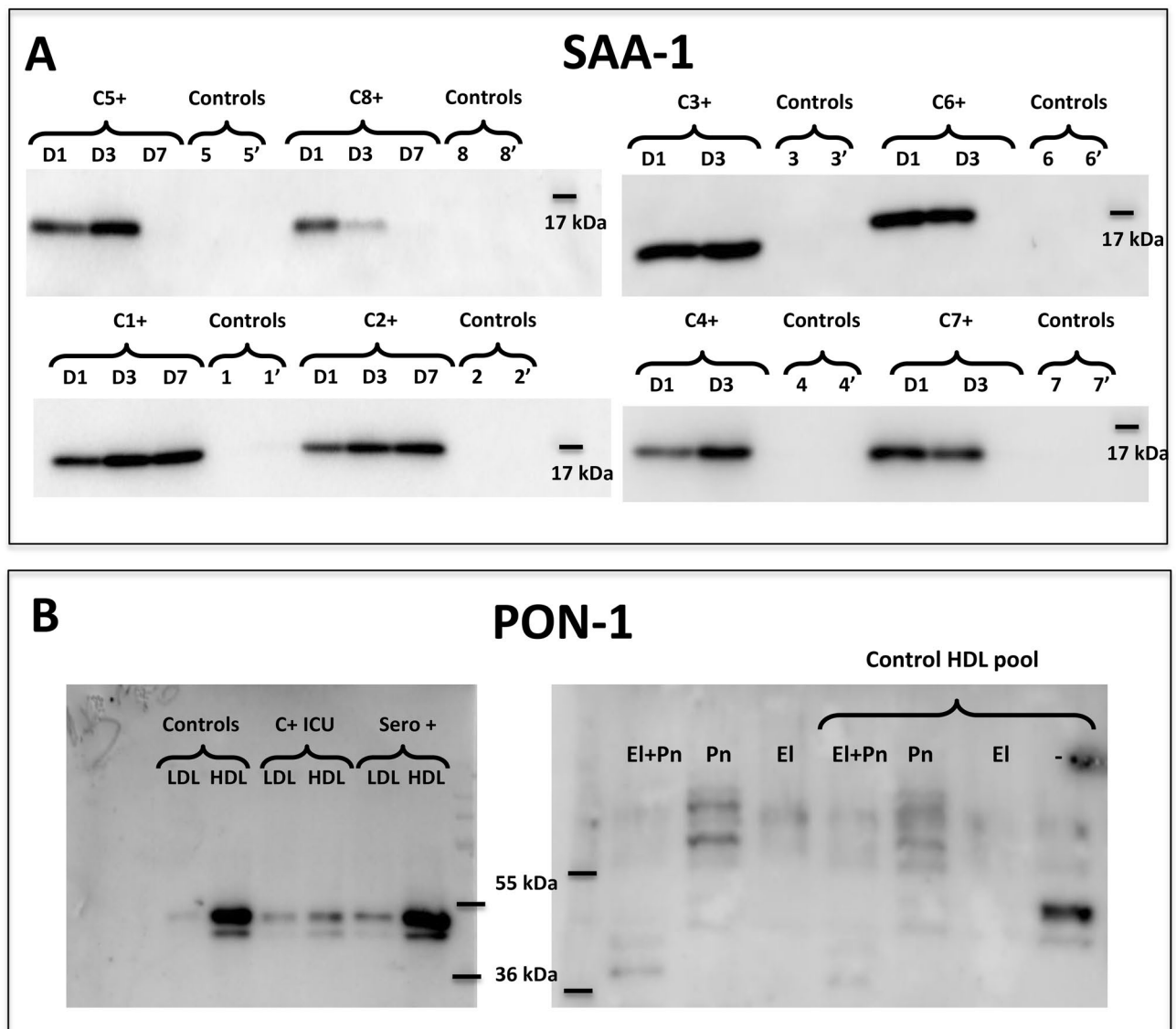


**Figure 1.** Relative abundance of proteins identified in HDLs isolated from of the plasma of control subjects (n = 15) and COVID-19 patients (n = 8) at admission in ICU (D1). The relative abundance of proteins in HDLs from controls and D1 COVID-19 patients was expressed as the Log<sub>2</sub> Abundance ratio (D1 COVID/Control), as described in the “Methods” section.

Beyond quantitative aspects reporting levels of LDL-C, HDL-C and total cholesterol, very few studies focus on lipoprotein composition and functionality. High-density lipoproteins are important for cholesterol metabolism, but also display major pleiotropic functions that could play a pivotal role in acute inflammatory conditions. A large body of evidence suggests that HDLs are globally protective for the endothelial layer, due to their antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-thrombotic functions<sup>8</sup>. HDL endothelial protective effects have been shown to be crucial in bacterial sepsis or lung emphysema, in which supplementation with functional HDLs or ApoA-I particles limited the deleterious effects of acute inflammation<sup>32,33</sup>. Both HDL composition and functionality are profoundly modified under pathological conditions, in cardiovascular disease<sup>11,13</sup> and in endotoxemia inflammation<sup>34</sup>. A recent proteomic analysis of plasma from septic patients secondary to community-acquired pneumonia and hospital acquired pneumonia demonstrated that proteins associated with HDLs were markedly decreased, including ApoA-I, C-I, A-IV, L1 and paraoxonase 1 whereas proteins of the acute phase

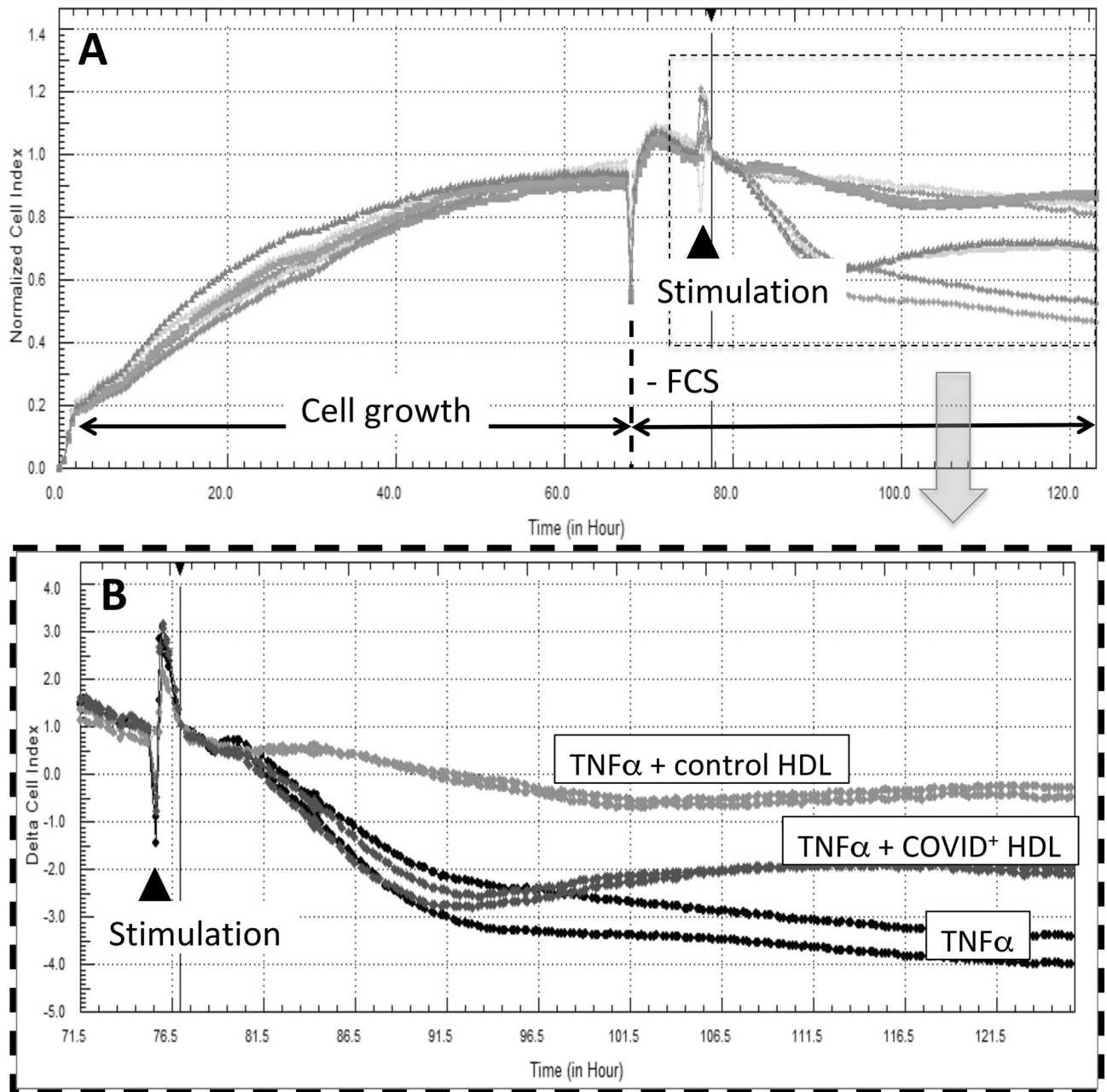


**Figure 2.** Percentage of protein abundance in HDLs from controls and COVID-19 patients. HDLs were isolated from the plasma of 15 controls and 8 patients with COVID-19 at admission (D1). Bar graphs represent the percentage of intensity  $\pm$  SD of the two groups. Unpaired t-test was used. \* $p < 0.0332$ , \*\* $p < 0.0021$ , \*\*\* $p < 0.0002$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  as compared to the control group.



**Figure 3.** Western blot analysis for detection of SAA and PON-1 in HDL isolated from COVID-19 patients and controls. HDLs (3  $\mu$ g protein /lane) were immunoblotted for SAA (serum amyloid A) (A) and PON-1 (paraoxonase 1) (B). (A) HDLs isolated from patients and controls are presented individually (C1+ = ICU-COVID-19 positive patient #1, C2+ for patient #2, etc.) at day 1, 3 and 7 after admission (D1, 3 and 7). Controls 1 and 1' correspond to HDLs isolated from healthy subjects sex- and age-matched to patient #1. (B) Pools of LDLs and HDLs were blotted for PON-1 (left panel) after isolation from non-infected healthy subjects ("Controls"), COVID-19 positive patients in intensive care unit ("C+ICU") (n=8) and SARS-CoV-2 seropositive cured caregivers ("sero+", sampled > 15 days after symptoms, n=7). A pool of control HDLs containing PON-1 was incubated with elastase (El, 20  $\mu$ g/mL), plasmin (Pn, 500  $\mu$ g/mL) or both proteases (El+Pn) for 2 h at 37  $^{\circ}$ C. Enzymes alone (without HDLs) treated in the same experimental conditions were loaded as control. Uncropped gels are presented in Supplementary information file.

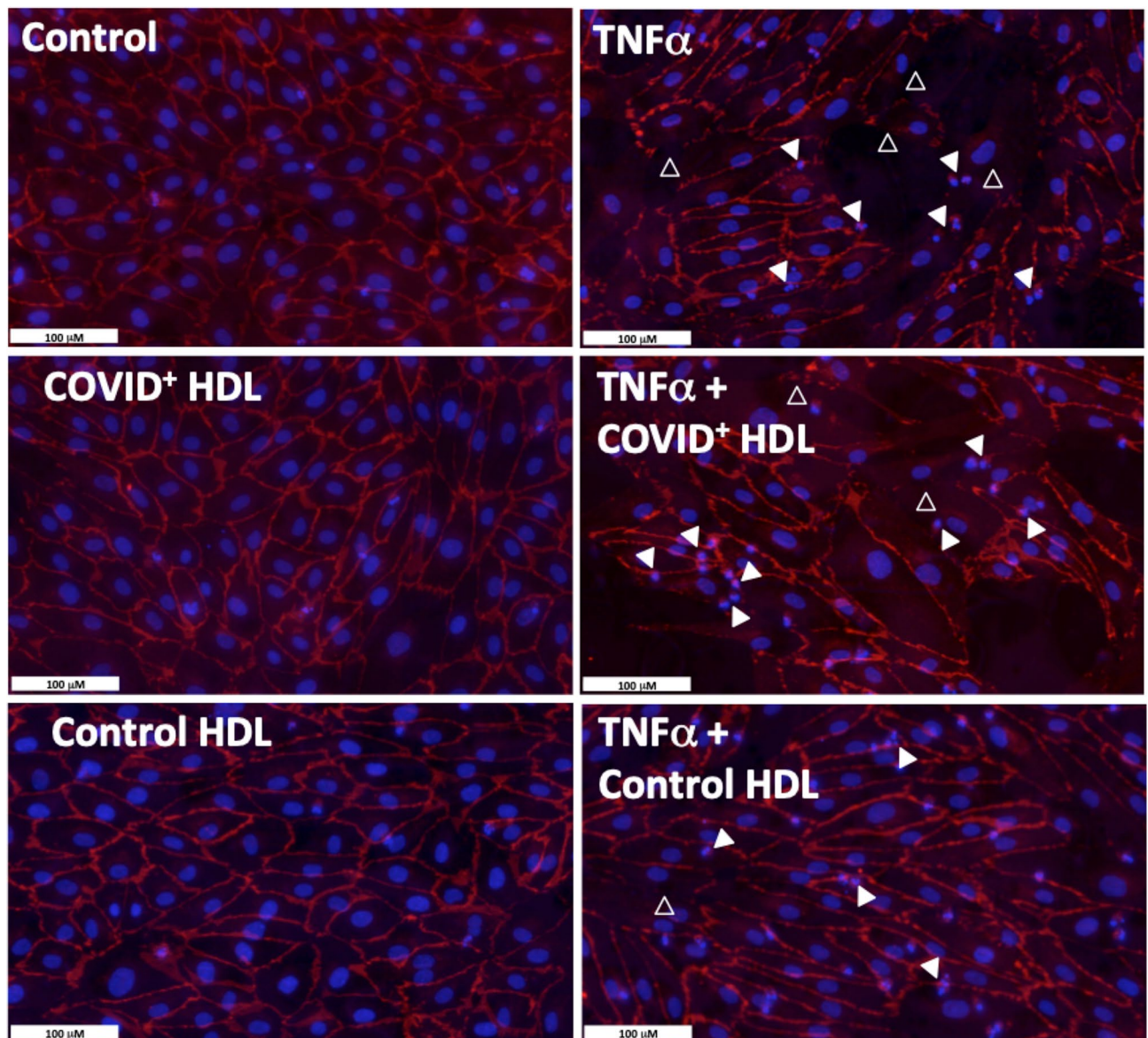
were increased (SAA, CRP, etc.) relative to control subjects<sup>35</sup>. In the present study, we aimed at characterizing HDL protein composition and endothelial protective effect by a mass-spectrometry-based proteomic approach in COVID-19 patients. HDL fraction was isolated by ultracentrifugation, starting from a small volume of plasma (400  $\mu$ L). Although this method is the gold standard for lipoprotein isolation, some proteins may be lost during the two steps of ultracentrifugation, and the sensitivity for proteomic identification may be insufficient to discover low-abundance proteins, due to the small amount of plasma initially available. However, under these conditions, we identified 83 proteins associated with HDLs. Among these proteins, most of the expected apolipoproteins associated with HDL were decreased, including ApoA-II, ApoC-I, II, III, IV, ApoA-IV, ApoC-I, ApoJ, Apo(a), ApoE, ApoM, ApoD, ApoB100 and ApoF. In addition, other proteins including beta2-glycoprotein 1, CD44 antigen and serum paraoxonases 1 and 3 were also less abundant in HDLs from COVID-19 patients. Paraoxonase 1 plays an important role in antioxidant HDL functions and was shown to be decreased in septic patients<sup>36,37</sup>. Here, we show that PON-1 is less abundant on HDL particles isolated from COVID-19 patients. We tested the



**Figure 4.** Real-time monitoring of HUVEC barrier dysfunction in response to TNF $\alpha$ +/-HDLs. Human umbilical vein endothelial cells (25,000 cells/well) were seeded on gelatin-coated xCELLigence 16 well E-plates. HDL were isolated from plasma of 16 controls and 8 D1 COVID ICU patients by ultracentrifugation and pooled into two groups: “Control HDL” and “COVID+ HDL”. The cell index was recorded continuously until confluence, when a plateau was reached [indicated cell growth in (A)]. Cells were then serum-deprived (- Fetal Calf Serum, FCS) for 6 h and then stimulated with 30 ng/mL TNF $\alpha$ +/-HDLs from COVID-19 patients or controls at 0.2 mg/mL. Cell indexes were normalized after stimulation [as indicated by the vertical line, in (A), 30 min. after the stimulation]. A magnification showing TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$  + COVID + HDL and TNF $\alpha$  + control HDL is presented in (B). Representative results from 2 independent experiments. HDLs isolated from each patient and matched controls (2 controls/patients) were analyzed separately (Supplementary Fig. 4A).

possibility of a proteolytic degradation of this antioxidant enzyme by elastase and plasmin. Neutrophil activation during COVID-19 produces elastase release potentially associated with neutrophil extracellular traps as well as an increased thrombus formation, leading to production of plasmin<sup>19,38</sup>. Both enzymes incubated with HDLs isolated from healthy subjects were able to degrade PON-1, suggesting that plasmin and/or elastase may participate in the decreased levels of HDL-associated PON-1. Conversely, other proteins were found to be more abundant in HDLs from COVID-19 patients, such as SAA-1 and 2, alpha-1 antitrypsin (AAT) and alpha-1 acid glycoprotein 1, considered as acute phase proteins. In a previous study, we reported an increased abundance of



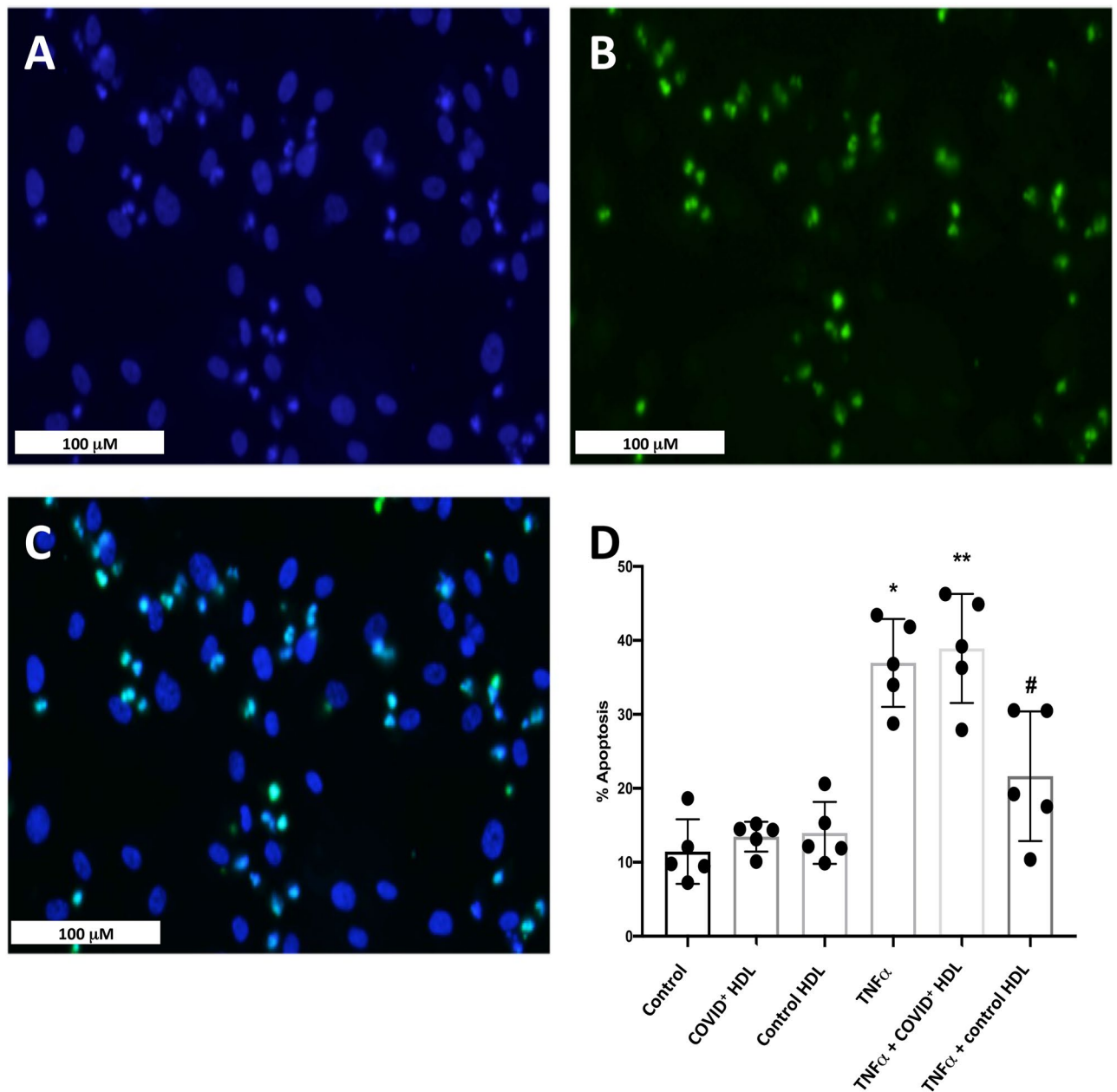


**Figure 5.** Effect of HDLs from controls and COVID-19 (C+) subjects on HUVEC apoptosis cells after stimulation with 30 ng/mL TNF $\alpha$  for 24 h. HDL were isolated from plasma of 16 controls and 8 D1 COVID-19 subjects by ultracentrifugation and pooled into two groups respectively “Control HDL” and “COVID+ HDL” Upper panel: immunostaining for VE-Cadherin (red) and nuclear staining with DAPI (blue). Empty white arrowheads show VE-Cadherin re-organization. Plain white arrowheads show examples of apoptotic nuclei (condensed and/or fragmented).

AAT associated with HDLs from ischemic stroke patients<sup>11</sup>. Here we have confirmed the proteomic results by western blot (Supplemental Figure 2) for AAT and SAA-1 that were clearly markedly associated with HDLs from COVID-19 patients. SAA has been shown to represent the most abundant protein of HDLs at the start of the sepsis and is then slowly replaced by ApoA-I during recovery<sup>39</sup>. In COVID-19, plasma SAA has recently been suggested as a biomarker of severity; patients with high initial levels of SAA levels were more likely to have poor computed tomography imaging<sup>40</sup>. SAA was suggested as a predictor of prognosis in patients with COVID-19, being significantly higher in non-survivors versus survivors, with a higher sensitivity relative to CRP<sup>41</sup>. In the present study, no difference was observed between survivors and non-survivors for any protein identified in HDLs from COVID-19 patients; this may be due to the small number of patients (4 survivors and 4 non-survivors).

Surfactant-associated protein B (SAPB) was found in HDLs but was not significantly more abundant in COVID-19 patients, albeit a trend was observed. SAPB has been identified previously in HDLs and shown to impair their antioxidant capacity<sup>42</sup>. SAPB has also been identified in HDLs from patients with end-stage renal disease, along with SAA and Apo C-II; these particles had reduced anti-inflammatory capacity<sup>43</sup>. High levels of HDL-associated SAPB were also found to predict mortality in heart failure patients<sup>44</sup>.

ApoA-I levels are significantly decreased in COVID-19 patients, suggesting a decreased synthesis by the liver and/or its replacement by SAA in HDLs. A recent study also reports decreased serum HDL-associated



**Figure 6.** TUNEL and DAPI staining- Quantification of apoptotic nuclei. In TNF $\alpha$ -treated HUVECs (30 ng/mL 24 h), dual staining shows a good correlation between morphological apoptotic features determined by nuclear condensation and fragmentation (DAPI in blue, A, C) and DNA fragmentation (green, B, C). Bar graph (D) represents the means  $\pm$  SD of apoptotic nuclei count in 5 fields (between 700 and 900 nuclei counted) of a representative experiment. \* $p=0.0332$  (Control vs TNF $\alpha$ ). \*\* $p=0.002$  (Control vs TNF $\alpha$  + COVID+ HDL). # $p=0.03$  (TNF $\alpha$  + control HDL vs TNF $\alpha$  + COVID+ HDL).

apolipoproteins in COVID-19 patients including Apo-AI, Apo-AII, Apo-H, Apo-LI, Apo-D and Apo-M; they also show an important increase in SAA-1 and 2<sup>45</sup>. In inflammatory conditions, SAA synthesis by the liver is increased and this acute phase protein was shown to associate with dense HDL particles (HDL<sub>3</sub>)<sup>46,47</sup>. We then tested potential correlations between HDL-associated protein abundance and the severity of COVID-19, assessed using SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score or SAPSII (Simplified Acute Physiology Score II). Negative correlations were observed between severity at admission (SAPSII) and ApoA-I, ApoA-II, phospholipid transfer protein (PLTP), serum paraoxonase 3 and SAA1, whereas apolipoprotein(a) was positively correlated with SAPSII. Apo(a) has been suggested to be an aggravating factor in COVID-19 due to its pro-thrombotic properties<sup>48</sup>, but there is currently no experimental or clinical data supporting this hypothesis. No correlation was observed between the SOFA score and any of the proteins identified in HDLs. This score is mainly related to sepsis and may not be very discriminating between patients, since COVID-19 is initially characterized by a severe pneumonia.



In addition to important modifications in protein cargo, we demonstrate that HDLs from COVID-19 patients were less protective for endothelial cells stimulated with TNF $\alpha$  than HDLs from healthy subjects. During COVID-19, increased endothelial permeability is expected to play an important role in organ failure subsequently to the SARS-Cov2 cytokine inflammatory storm<sup>49</sup>. We tested the protective effects of HDLs from patients and controls in HUVECs stimulated with TNF $\alpha$ . Endothelial barrier dysfunction was monitored by xCELLigence real-time cell analysis. Endothelial adherent cells impede the electron flow (impedance); this parameter is expressed as arbitrary units called cell index, and shown to decrease in case of detachment and increased permeability<sup>50</sup>. HDLs from COVID-19 patients displays a blunted protective effects against HUVEC permeability, VE-cadherin peripheral belt the cell–cell disruption and apoptosis induced by TNF $\alpha$ . Interestingly, HDLs isolated from COVID-19 survivor patients showed a trend towards a better protection than HDLs from non-survivors ( $p = 0.057$ ).

One limitation of our study could be the low number of COVID-19 patients tested. HDLs were isolated from each patient and tested individually or as a pool for their anti-inflammatory capacity and by western blot. These techniques are suitable only for a limited number of samples. COVID-19 and controls were well matched for sex and age and two controls were included for each case. The magnitude of the difference observed between groups is compatible with the small number of samples tested (in total 20 COVID-19 and 16 controls). Due to the limited amount of HDLs, we did not test for the reverse cholesterol transport capacity of HDLs from COVID-19 *versus* healthy subjects, but rather their anti-inflammatory and anti-apoptotic functions on endothelial cells. These properties are of particular importance in the context of COVID-19 in which the endothelium is exposed to the inflammatory cytokine storm<sup>9</sup>.

The main findings of our study are that HDL particles from patients suffering COVID-19 are characterized by quantitative and qualitative abnormalities relative to those isolated from healthy subjects. Low levels of HDLs in ICU severe COVID-19 patients associated with an important dysfunction, characterized by a loss of protective effect towards endothelial cells in inflammatory conditions, supports the relevance of a potential therapy relying on HDL supplementation during the acute phase of COVID-19.

## Methods

**Study population.** COVID-19 patients were enrolled in a monocentric study conducted in the surgical ICU of Bichat Claude-Bernard University Hospital, Paris, France. Patients admitted for sepsis due to COVID-19 pneumonia were consecutively and prospectively included. The study was approved by our local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile-de-France n° 1, Aposize study, RCB: A02267-46). Patient demographics, Simplified Acute Physiology Score II (SAPSII), Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) severity scores and clinical data were collected. Mortality at 28 days, duration of mechanical ventilation, number of days alive without mechanical ventilation at day 28, length of stay in the ICU and in the hospital, renal replacement therapy, vasopressor use, need for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), and tracheostomy were collected. A number of prone positioning procedures and ventilator-associated pneumonia were also collected. At admission (D1), D3 and D7, 5 mL EDTA blood samples were collected and the plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Plasma concentrations of total cholesterol (TC), HDL-C, LDL-C, and triglycerides (TG) were also measured at each time (D1, D3 and D7) in the Biochemistry Laboratory of Bichat Claude-Bernard Hospital by routine enzymatic assays (CHOL, HDL-C, LDL-C and TRIG methods, Dimension VISTA System, Siemens Healthineers). The reference values for these assays were as follows: HDL-C:  $>1.40$  mmol/L; TC:  $4.40 < N < 5.2$  mmol/L; and triglycerides:  $0.50 < N < 1.7$  mmol/L. According to the recommendations of the French National Authority for Health 2017 and the European Society of Cardiology 2016, LDL-C concentration targets have been established depending on vascular risk factors<sup>51</sup>. Control plasma from healthy volunteers were sampled from caregivers of the University Hospital Center of Reunion Island, after obtaining ethical committee approval (Comités de Protection des Personnes, Nord Ouest IV de Lille, France; number EudraCT / ID-RCB 2020-A01253-36). All participants gave their informed consent and were fasting before venous puncture. Blood was sampled in 10 mL EDTA tubes and plasma was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Age, gender, body mass index (BMI) and comorbidities were collected for all participants. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

**Lipoprotein isolation from plasma.** Lipoproteins were isolated from EDTA-plasma by a classical 2-steps sequential density ultracentrifugation as described previously<sup>52</sup>. All the following procedure has been performed under a Class II microbiological safety workbench. Briefly, the density of plasma was adjusted to 1.063 using potassium bromide (KBr): 99  $\mu\text{L}$  of KBr solution ( $d = 1.35$ ) were added to 500  $\mu\text{L}$  of plasma, which was then overlaid to 1 mL of KBr saline solution ( $d = 1.063$ ). The 2 mL tube was then filled with 300  $\mu\text{L}$  of KBr solution ( $d = 1.063$ ). Ultracentrifugation was performed at 250,000 g for 20 h at  $10^{\circ}\text{C}$  in a 50.4Ti rotor using a Beckman Coulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge. The upper lipoprotein fraction containing LDLs (orange layer) was recovered as a single band, and the KBr was eliminated by 3 washing steps ( $3 \times 500$   $\mu\text{L}$  of Saline EN (0.9% NaCl, 1 mM EDTA, and 0.025%  $\text{NaN}_3$ )) using a centrifugal filter device (Amicon Ultra, 3 KDa cut off, UFC500396). The density of the bottom fraction (150  $\mu\text{L}$ ) resulting from the first ultracentrifugation and containing HDLs was adjusted to 1.21 g/mL with KBr (by adding 525  $\mu\text{L}$  of KBr  $d = 1.35$ ) and overlaid with 1 mL of KBr saline solution ( $d = 1.21$ ). The second ultracentrifugation and subsequent washing steps were similar to those for the 1.063 lipoprotein fraction. 150  $\mu\text{L}$  of HDL fraction were recovered, desalted and concentrated to 100  $\mu\text{L}$  with saline EN solution. The total protein concentration was measured in triplicate using a Bradford Ultra kit (Expedeon, Cambridge, UK, EX-BFU05L). The purity of the HDL fraction was evaluated by sodium dodecyl sulfate- 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis using rabbit anti-ApoA-I polyclonal antibody (Abcam, ab52945 used at 1:4,000 = 47.5 ng/mL).

**HDL sample preparation for mass spectrometry.** HDL total protein concentration was determined by using the BradfordUltra test, following the manufacturer's instructions. Bovine serum albumin was used as standard. Briefly, 3  $\mu\text{g}$  of isolated HDL were diluted in 300  $\mu\text{L}$  of digestion buffer (50 mM ammonium bicarbonate) and then reduced with 20 mM DTT for 20 min at 60 °C before alkylation with 40 mM iodoacetamide (30 min at room temperature in the dark). Samples were subjected to proteolytic digestion with 3  $\mu\text{g}$  of trypsin-tosylphenylalanyl chloromethyl ketone (Sigma) overnight at 37 °C. Digested peptides were acidified with 20% trifluoroacetic acid. After 15 min at 4 °C, peptides were collected by centrifugation at 10,000 $\times$ g for 15 min at 10 °C and desalted using Pierce peptide desalting spin columns (Thermo Fisher Scientific, part no. 2162704). Eluted peptides were dried in a Speed Vacuum before being concentrated and purified again using C18 Tips (Thermo Fischer Scientific, part no. 87782). Peptides were eluted with 20  $\mu\text{L}$  of 40% acetonitrile in 0.1% TFA and dried under vacuum prior to LC-MS/MS analysis.

**NanoLC-MS/MS analysis.** The tryptic peptide digests were resuspended in 7  $\mu\text{L}$  of 4% acetonitrile (ACN) in 0.1% TFA and analyzed by nano-LC using a Thermo Fisher Ultimate 3000 series NCS-3500 RS coupled with NSI-Q-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Briefly, 5  $\mu\text{L}$  of sample were separated on a LC-EASY-spray C18 column (2.6  $\mu\text{m}$ , 100 Å, 75  $\mu\text{m}$   $\times$  25 cm, Thermo Fisher Scientific). Peptides were eluted using two steps linear gradient from 4 to 27.5% solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) for 127 min and then from 27.5 to 44% solvent B for 18 min. A washing step was then carried out with 90% solvent B for 5 min followed by an equilibration step with 4% solvent B for 25 min. Solvent A was 0.1% formic acid in water. The column temperature was held at 40 °C and the flow-rate was set to 300 nL/min. The mass spectrometry analysis was performed with the following conditions: spray voltage 2 kV, heated capillary temperature: 275 °C and S-lens RF level: 30%. Mass spectra were acquired with XCalibur 4.2.47 software (Thermo Fisher Scientific) and registered in data-dependent acquisition with the mass spectrometer operating in positive mode. Survey full scan mass spectra were acquired in the 350 to 2,000  $m/z$  range at a resolving power of 70,000 (at  $m/z$  400) with an automatic gain control (AGC) target of  $1e^6$  and maximum injection time (max IT) of 120 ms. Top 10 precursors were selected for MS/MS spectra, with a resolution at 17,500 (at  $m/z$  400), AGC target of  $1e^5$  and max IT of 64 ms. Peptides were fragmented by higher energy collisional dissociation (HCD, 28% normalized collision energy). Dynamic exclusion was activated with a repeat duration of 60 s. Charge state screening was enabled, and precursors with either unknown or 1<sup>+</sup> charge states were excluded. Injection of blank (4% acetonitrile in 0.1% TFA) was performed before and after samples to prevent carry-over. The Orbitrap performance was evaluated weekly and external calibration of the mass spectrometer was performed prior to analysis with a LTQ ESI positive ion calibration solution (Pierce).

**Protein identification and quantification.** Raw mass spectrometry data were automatically processed using Proteome discoverer software (version 2.2.2.2.0, Thermo Fisher Scientific) for protein identification and quantification. MS and MS/MS spectra were searched against Uniprot human reference proteome database with canonical and isoform sequences (20,421 sequences; 04 June 2019) using SEQUEST HT search engine. The database search was performed with the following parameters: oxidized methionine and protein N-terminal acetylation were set as variable modifications, and Cysteine carbamidomethylation was set as a fixed modification. Trypsin was set as enzyme specific and two missed cleavages allowed. A mass tolerance of 10 ppm was used for precursor ions and 0.02 Da for product ions. The false-discovery rate (FDR) was fixed to 1% at the level of proteins and peptides using a target-reversed decoy database search strategy. A minimum of one unique peptide sequence with a Sequest score ( $X_{\text{corr}} \geq 2$ ) was used. For peptides with an  $X_{\text{corr}} < 2$ , identification was confirmed by manual interpretation of corresponding MS/MS spectrum. A label-free quantification was performed on identified proteins by using the peak intensities of validated peptides for a given protein. Both unique and razor peptides were used for quantification. The list of proteins and peptides used for identification and quantification is shown in Supplementary material.

**Data processing.** All computations were calculated with Excel (Microsoft) and Proteome discoverer software (version 2.2.2.2.0). Group protein abundance was defined as the mean of protein intensity of all samples for each group (D1 COVID+ vs control). Protein intensity was defined as the sum of peptide intensities of the considered protein for each individual. Abundance ratio is the ratio of the protein abundance of the COVID group to that of control subjects. Then, the Log (2) abundance ratio was calculated to show differences between groups.

**Western-blot analysis.** Classical SDS-PAGE migration (12% polyacrylamide) was carried out in order to separate the proteins contained in the HDL fraction, followed by a liquid transfer to nitrocellulose membrane, as previously described<sup>52</sup>. The following primary antibodies were used: anti-paraoxonase 1 (Abcam, ab24261, used at 1:1000 dilution = 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), anti-serum amyloid A-1 (Abcam, ab190802, used at 1:10,000 dilution = 42 ng/mL), anti-alpha-1 antitrypsin (Calbiochem, catalog no. 178260, used at 1:1,000), anti-ApoA-I (Abcam, ab52945 used at 1:4,000 = 47.5 ng/mL).

**Real-time monitoring of HUVEC barrier dysfunction.** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from human umbilical cords of patients who delivered babies at Sainte-Clotilde Clinic (Saint-Denis de La Réunion, France), with informed consent, according to French Law L.1243-3 modified by articles R1243-49 to 56, requiring the declaration of "Biobanking and preparation of cells and tissues from human body for research purpose" to MESR (French higher education and research ministry), Inserm (French National Institute for Health and Medical Research), and ANSM (French National Agency for Medicines and

Health Products Safety) with the following references. Inserm: C 19-23, IDRCB: 2019-A01137-50, and MESR: DC-2016-2614. HUVECs were obtained from three human donors. Umbilical cords were resected rapidly after birth, and immediately stored in sterile saline solution (PBS). HUVECs were detached from umbilical veins using collagenase NB6 solution (Nordmark biochemical, N0003224, used at 5 mg/mL) for 10 min at 37 °C. Then, cells were cultured in complete endothelial cell growth medium EGM-2 (Lonza, Basel, Switzerland) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and maintained using standard cell culture. After reaching confluence, HUVECs were detached using 0.25% trypsin-EDTA and seeded at a concentration of 25,000 cells/well on gelatin-coated xCELLigence 16 well E-plates (Acea Biosciences, San Diego, CA, United States). Cell index was recorded continuously during cell growth until confluence, when a plateau was reached (until 70 h). HUVECs were serum-deprived for 6 h before stimulation with TNF $\alpha$  (10 ng/mL) in the presence or not of 50  $\mu$ g/mL HDLs from COVID-19 or control subjects. Cell index measurements were automatically collected every 15 min from 0 to 120 h.

**TUNEL reaction and VE-Cadherin immunostaining.** HUVECs were seeded at 50,000 cells/well in Millicell 8-well EZ Slides (Merck, Molsheim, France) in complete EGM-2 medium supplemented with 5% fetal calf serum. After reaching confluence, HUVECs were serum-deprived for 6 h before stimulation with TNF $\alpha$  (10 ng/mL) in the presence or not of 50  $\mu$ g/mL HDLs from COVID-19 or control subjects for 24 h. Cells were rinsed with PBS and then fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Terminal transferase dUTP nick-end labeling reaction was performed according to the manufacturer's instructions (Roche, Cat. No. 11 772 465 001). After 5 min wash with PBS, cells were permeabilized with 0.1% Triton X100 in 0.1% sodium citrate for 2 min on ice. Positive control was realized with 500 U/mL DNase I for 10 min at 20 °C. After washing with PBS, the reaction mixture containing fluorescein-labelled dUTP was added to the wells for 2 h at 37 °C in a humidified chamber. For VE-cadherin immunostaining, non-specific antigenic sites were blocked by 2.5% BSA in PBS and the slides were then incubated with anti-VE-Cadherin antibody (Abcam, Ab33168) at 1  $\mu$ g/mL in 1% BSA for 90 min at room temperature in a humidified chamber. After 3 washes with PBS, a goat anti-rabbit conjugated to Alexa 594 nm was applied for 1 h at RT, in PBS containing 1% BSA. The slides were rinsed 5 times with PBS, incubated with 0.1  $\mu$ g/mL DAPI for 10 min at RT, washed with PBS and finally with water before mounting in fluorescence medium and image captured using a NanoZoomer S60 digital slide scanner.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was carried out with Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Continuous variables were expressed as medians with interquartile ranges (IQRs). Statistical significance was assessed using a Mann–Whitney test to compare COVID-19+ patients versus controls, unpaired t-test to compare percentages and Wilcoxon paired test when appropriate. *p* values < 0.05 were required for significance. Spearman test was used for non-parametric assessment of correlations.

Received: 19 October 2020; Accepted: 8 January 2021

Published online: 27 January 2021

## References

- Hirano, T. & Murakami, M. COVID-19: A new virus, but a familiar receptor and cytokine release syndrome. *Immunity* **52**, 731–733. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.003> (2020).
- Fan, J. *et al.* Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metabolism* **107**, 154243. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154243> (2020).
- Wang, D. *et al.* Correlation analysis between disease severity and clinical and biochemical characteristics of 143 cases of COVID-19 in Wuhan, China: A descriptive study. *BMC Infect. Dis.* **20**, 519. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05242-w> (2020).
- Hu, X., Chen, D., Wu, L., He, G. & Ye, W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin. Chim. Acta* **510**, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.07.015> (2020).
- Tanaka, S. *et al.* Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLoS ONE* **15**, e0239573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239573> (2020).
- Huang, W. *et al.* Decreased serum albumin level indicates poor prognosis of COVID-19 patients: Hepatic injury analysis from 2,623 hospitalized cases. *Sci China Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1733-4> (2020).
- Tanaka, S. *et al.* High-density lipoproteins during sepsis: From bench to bedside. *Crit. Care* **24**, 134. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-02860-3> (2020).
- Tran-Dinh, A. *et al.* HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 493–511. <https://doi.org/10.1111/bph.12174> (2013).
- Ackermann, M. *et al.* Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in covid-19. *N Engl J Med* **383**, 120–128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432> (2020).
- Delbosc, S. *et al.* Impaired high-density lipoprotein anti-oxidant capacity in human abdominal aortic aneurysm. *Cardiovasc. Res.* **100**, 307–315. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt194> (2013).
- Ortiz-Munoz, G. *et al.* Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis* **253**, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.08.035> (2016).
- Tanaka, S. *et al.* High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann. Intensive Care* **9**, 68. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0541-8> (2019).
- Vaisar, T. *et al.* Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J. Lipid Res.* **56**, 1519–1530. <https://doi.org/10.1194/jlr.M059089> (2015).
- Van Lenten, B. J. *et al.* Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J. Clin. Invest.* **96**, 2758–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI118345> (1995).
- Skaggs, B. J., Hahn, B. H., Sahakian, L., Grossman, J. & McMahon, M. Dysfunctional, pro-inflammatory HDL directly upregulates monocyte PDGFRbeta, chemotaxis and TNFalpha production. *Clin. Immunol.* **137**, 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.06.014> (2010).

16. Meilhac, O., Tanaka, S. & Couret, D. High-density lipoproteins are bug scavengers. *Biomolecules* **10**, 598. <https://doi.org/10.3390/biom10040598> (2020).
17. Karlsson, H., Leanderson, P., Tagesson, C. & Lindahl, M. Lipoproteomics II: Mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **5**, 1431–1445. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401010> (2005).
18. Vaisar, T. *et al.* Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J. Clin. Invest.* **117**, 746–756. <https://doi.org/10.1172/JCI26206> (2007).
19. Thierry, A. R. Anti-protease treatments targeting plasmin(ogen) and neutrophil elastase may be beneficial in fighting COVID-19. *Physiol Rev* **100**, 1597–1598. <https://doi.org/10.1152/physrev.00019.2020> (2020).
20. Sugano, M., Tsuchida, K. & Makino, N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 872–876. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2877> (2000).
21. Escargueil-Blanc, I. *et al.* Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 331–339. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.2.331> (1997).
22. Chavakis, E. & Dimmeler, S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 887–893. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000017728.55907.a9> (2002).
23. Gavriatopoulou, M. *et al.* Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clin. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1007/s10238-020-00648-x> (2020).
24. Sorokin, A. V. *et al.* COVID-19-associated dyslipidemia: Implications for mechanism of impaired resolution and novel therapeutic approaches. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1096/fj.202001451> (2020).
25. McKeage, K. & Perry, C. M. Propofol: A review of its use in intensive care sedation of adults. *CNS Drugs* **17**, 235–272. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317040-00003> (2003).
26. Levels, J. H. M., Abraham, P. R., van den Ende, A. & van Deventer, S. J. H. Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin. *Infect. Immun.* **69**, 2821–2828. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001> (2001).
27. Lima, W. G., Souza, N. A., Fernandes, S. O. A., Cardoso, V. N. & Godoi, I. P. Serum lipid profile as a predictor of dengue severity: A systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* **29**, e2056. <https://doi.org/10.1002/rmv.2056> (2019).
28. Negro, F. Abnormalities of lipid metabolism in hepatitis C virus infection. *Gut* **59**, 1279–1287. <https://doi.org/10.1136/gut.2009.192732> (2010).
29. Parra, S. *et al.* Serum paraoxonase-1 activity and concentration are influenced by human immunodeficiency virus infection. *Atherosclerosis* **194**, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.07.024> (2007).
30. Kimhofer, T. *et al.* Integrative modelling of quantitative plasma lipoprotein, metabolic and amino acid data reveals a multi-organ pathological signature of SARS-CoV-2 infection. *J. Proteome Res.* <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00519> (2020).
31. Wang, G. *et al.* Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients: An observational study. *Lipids Health Dis.* **19**, 204. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01382-9> (2020).
32. Moreno, J. A. *et al.* High-density lipoproteins potentiate alpha-1-antitrypsin therapy in elastase-induced pulmonary emphysema. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **51**, 536–549. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0103OC> (2014).
33. Tanaka, S. *et al.* Reconstituted high-density lipoprotein therapy improves survival in mouse models of sepsis. *Anesthesiology* **132**, 825–838. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003155> (2020).
34. de la Llera Moya, M. *et al.* Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis* **222**, 390–394. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.032> (2012).
35. Sharma, N. K. *et al.* Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clin Proteomics* **16**, 29. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9252-2> (2019).
36. Novak, F. *et al.* Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clin. Exp. Med.* **10**, 21–25. <https://doi.org/10.1007/s10238-009-0059-8> (2010).
37. Watson, A. D. *et al.* Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **96**, 2882–2891. <https://doi.org/10.1172/JCI118359> (1995).
38. Ji, H. L., Zhao, R., Matalon, S. & Matthay, M. A. Elevated plasmin(ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiol. Rev.* **100**, 1065–1075. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2020> (2020).
39. van Leeuwen, H. J. *et al.* Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **31**, 1359–1366. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51> (2003).
40. Li, H. *et al.* Serum amyloid A is a biomarker of severe coronavirus disease and poor prognosis. *J. Infect.* **80**, 646–655. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.035> (2020).
41. Cheng, L. *et al.* Prognostic value of serum amyloid A in patients with COVID-19. *Infection* <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01468-7> (2020).
42. Banfi, C. *et al.* Immature surfactant protein-B impairs the antioxidant capacity of HDL. *Int. J. Cardiol.* **285**, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.02.057> (2019).
43. Weichhart, T. *et al.* Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 934–947. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011070668> (2012).
44. Emmens, J. E. *et al.* Proteomic diversity of high-density lipoprotein explains its association with clinical outcome in patients with heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **20**, 260–267. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1101> (2018).
45. Shen, B. *et al.* Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera. *Cell* **182**, 59–72 e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.032> (2020).
46. Coetzee, G. A. *et al.* Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J. Biol. Chem.* **261**, 9644–9651 (1986).
47. Parks, J. S. & Rudel, L. L. Alteration of high density lipoprotein subfraction distribution with induction of serum amyloid A protein (SAA) in the nonhuman primate. *J. Lipid Res.* **26**, 82–91 (1985).
48. Moriarty, P. M. *et al.* Lipoprotein(a) and its potential association with thrombosis and inflammation in COVID-19: A testable hypothesis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **22**, 48. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00867-3> (2020).
49. Polidoro, R. B., Hagan, R. S., de Santis Santiago, R. & Schmidt, N. W. Overview: Systemic inflammatory response derived from lung injury caused by SARS-CoV-2 infection explains severe outcomes in COVID-19. *Front. Immunol.* **11**, 1626. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01626> (2020).
50. Hamidi, H., Lilja, J. & Ivaska, J. Using xCELLigence RTCA instrument to measure cell adhesion. *Bio Protoc.* **7**, e2646. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2646> (2017).
51. Catapano, A. L. *et al.* 2016 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur. Heart J.* **37**, 2999–3058. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw272> (2016).
52. Ortiz-Munoz, G. *et al.* HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J.* **23**, 3129–3139. <https://doi.org/10.1096/fj.08-127928> (2009).



## Acknowledgements

This research was funded by FEDER RE0001897 (EU—Région Réunion—French State national counterpart), by Université de La Réunion (COVID-19 emergency seed funding) as well as by the BIOST Fédération. We thank Nicolas Bouscaren, Maxime Cournot and Lucie Auzanneau for their help in methodology and project management (H-COV-RUN study).

## Author contributions

OM, DC and ST designed the study. FB, ST, ZM, PR, ND, ATD, MLX, TR acquired the data. FB, OM, ND, BV, ST, analyzed the data. ST, ATD, DC, EV and MLX cared for the patients included in this study. OM, FB, ZM wrote the manuscript, and PR, BV, ND, ATD, PM and DC critically reviewed the manuscript. All authors reviewed the manuscript. OM and DC contributed equally to this work.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81638-1>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to O.M.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021





# Article 3

En soumission

## Atherogenic lipoprotein modifications during severe COVID-19

**Floran BEGUE**, Bryan VEEREN, Marie Laurine APALAMA, Zarouki MOUKTADI, Patrick MAVINGUI, Brice LORTAT-JACOB-, Enora ATCHADE, Nathalie ZAPPELLA, Marie LAGRANGE-XÉLOT, Philippe MONTRAVERS, Philippe RONDEAU, David COURET, Sébastien TANAKA, and Olivier MEILHAC.





# Atherogenic lipoprotein modifications during severe COVID-19

Floran BEGUE<sup>1</sup>, Bryan Veeren<sup>1</sup>, Marie Laurine Apalama<sup>1</sup>, Zarouki Mouktadi<sup>1</sup>, Patrick Mavingui<sup>2</sup>, Brice Lortat-Jacob<sup>3</sup>, Enora Atchade<sup>3</sup>, Nathalie Zappella<sup>3</sup>, Marie Lagrange-Xelot<sup>4</sup>, Philippe MONTRAVERS<sup>3,4,6</sup>, Philippe Rondeau<sup>1</sup>, David COURET<sup>1</sup>, Sébastien TANAKA<sup>1,3</sup>, and Olivier MEILHAC<sup>1,4\*</sup>.

1. INSERM, UMR 1188 Diabète Athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Université de La Réunion, 97410 Saint-Pierre de La Réunion, France
2. Unité Mixte Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de la Réunion, INSERM U1187, CNRS UMR 9192, IRD UMR 249, Plateforme Technologique CYROI, 94791 Sainte Clotilde, France
3. Assistance Publique—Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Assistance, Bichat-Claude Bernard Hospital, 75018 Paris, France
4. CHU de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France
5. UFR Denis Diderot, University of Paris, 75015 Paris, France
6. French Institute of Health and Medical Research (INSERM) U1152, Physiopathology and Epidemiology of Respiratory Diseases, 75018 Paris, France

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

## **Abstract**

**Background:** SARS-CoV-2 infection has effects that extend beyond lung damage to lipid metabolism. Indeed, low levels of HDL and LDL cholesterol have been shown to be associated with disease severity. However, the impact of COVID-19 on the size and composition of low-density lipoproteins remains poorly understood. The purpose of this study was to characterize LDL subpopulations and investigate the protein composition of LDL in patients with severe COVID-19.

**Methods:** Between November 2020 and March 2021, 52 patients with COVID-19 were recruited upon admission to the intensive care unit. Different LDL subpopulations were quantified using native polyacrylamide gel electrophoresis. The LDL fraction from a subset of COVID-19 patients and age- and sex-matched controls was isolated by ultracentrifugation. Proteomic analysis of the LDL fraction was performed by NanoLC-MS/MS. Validation of abundance of certain proteins was assessed by Western blot (Apolipoproteins J and A-I, serum amyloid A-I, and alpha-1 antitrypsin).

**Result:** Patients with COVID-19 had higher levels of VLDL, IDL-B, and small and dense LDL, whereas they had lower levels of large LDL compared with controls. The LDL fraction of COVID-19 patients was enriched in acute phase proteins (SAA-1, AAT) and depleted in some apolipoproteins (Apo A-I, Apo C-I, Apo C-IV) relative to controls. Apo J, SAA-I, and AAT were confirmed by Western blot to be increased in the LDL fraction of COVID-19 patients compared with controls, whereas Apo A-I was decreased.

**Conclusion:** In conclusion, we have shown that the distribution of LDL subpopulations is altered and the LDL proteome is remodeled during COVID-19 disease.

**Keywords:** LDL, COVID-19, sdLDL, subpopulations, proteome, Lipoprint.

## 1. Introduction

Coronavirus 2019 disease (COVID-19), caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), is a global pandemic that has caused over 6 million deaths [1, 2]. COVID-19 has a wide range of clinical manifestations from asymptomatic forms comparable to an influenza-like state to forms of respiratory failure that can be accompanied by systemic failure and death. The cytokine storm during the early phase of COVID-19 is characterized by production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) [3]. Concomitant with this inflammatory state, numerous studies have shown significant changes in lipid metabolism in the acute phase of COVID-19. Lipids including triglycerides and cholesterol are transported by lipoproteins consisting in macromolecular complexes that associate lipids and proteins. Lipoproteins are composed of very-low density lipoproteins (VLDL), intermediate density (IDL), low density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL) [4]. In clinical practice, only the levels of total cholesterol (TC) or associated with LDL (LDL-C) and HDL (HDL-C) are measured. Moreover, at the time of admission to the intensive care unit (ICU), a drop in TC, LDL-C and HDL-C levels is observed and some studies suggest that HDL-C and LDL-C levels are inversely correlated with disease severity [5, 6]. In addition to quantitative changes in the cholesterol content of these lipoproteins, qualitative modulation has been observed in COVID-19 patients in terms of their size and lipid or protein composition [7]. During bacterial sepsis, not only HDL but also LDL and VLDL may participate in the clearance of LPS from gram-negative bacteria, in addition to their primary function of cholesterol transport [8]. We showed in our previous study that there is an association between low levels of LDL-C and HDL-C and mortality in COVID-19 patients with secondary bacterial infection [9]. In acute inflammatory situations such as during COVID-19, the generated cytokine storm can induce a hepatic response via secretion of acute phase proteins such as reactive protein-C (CRP) and serum amyloid-A (SAA), and a decreased in albumin and lipoprotein levels [10, 11]. In our previous study, we were able to show that HDL were altered during COVID-19. In addition to the decrease in HDL-C concentration, we showed changes in composition and functionality of these lipoproteins. The HDL proteome of COVID-19 patients is enriched in acute phase proteins such as SAA and alpha-1-antitrypsin and poorer in apolipoproteins such as apolipoprotein A-I (Apo A-I). We also showed that HDL in these patients were less functional with a loss of their anti-apoptotic property [12]. While the overall vasculo-protective role of HDL seems well established including during COVID-19, that of LDL is less clear. The fact that the concentrations of these lipoproteins are decreased and that they may participate in the clearance of microbial components during sepsis raise questions about their role as a biomarker or actor during this acute inflammatory episode. It is not known whether LDL are, like HDL, remodeled during SARS-Cov2 infection that may reflect the severity of the disease. The objective of our study is to characterize LDL particles of COVID-19 patients by studying the plasma LDL subpopulations as well as the protein composition of LDL. For this purpose, the analyses were performed on the plasma of COVID-19 patients on the day of their admission to ICU. The subpopulations (size) of LDL from these patients were determined by

electrophoresis under non-denaturing and non-reducing conditions. Shotgun proteomic analysis was also performed on the LDL fraction isolated by ultracentrifugation.

## **2. Materials and methods**

### ***2.1. Study population***

Patients admitted for severe COVID-19 pneumonia were consecutively and prospectively included in the LIPICOR “LIPId profile changes in Inflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2” study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05113836). This study was approved by the appropriate French ethics committee (Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV, ID-RBC: 2020-A02638-31, approved on 07/12/2020). Written informed consent was obtained from each patient. This is a monocentric study conducted in the surgical ICU of Bichat Claude-Bernard University Hospital, Paris, France. Patient demographics, Simplified Acute Physiology Score II (SAPSI), Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) severity scores and clinical data were collected. Mortality at 28 days, duration of mechanical ventilation, number of days alive without mechanical ventilation at day 28, length of stay in the ICU and in the hospital, renal replacement therapy, vasopressor use, need for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), and tracheostomy were collected.

At admission (Day 1, D1), 5 mL EDTA blood samples were collected and the plasma was stored at – 80°C. Plasma concentrations of total cholesterol (TC), HDL-C, LDL-C, and triglycerides (TG) were measured at D1 in the Biochemistry Laboratory of Bichat Claude-Bernard Hospital by routine enzymatic assays (CHOL, HDL-C, LDL-C and TRIG methods, Dimension VISTA System, Siemens Healthineers). The reference values for these assays were as follows: HDL-C: > 1.00 mmol/L; TC: < 5.0 mmol/L; and: N TG < 1.7 mmol/L. According to the recommendations of the French National Authority for Health 2017 and the European Society of Cardiology 2016, LDL-C concentration targets have been established depending on vascular risk factors [13].

Control plasma from healthy volunteers were sampled from caregivers of the University Hospital Center of Reunion Island (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04384705), after obtaining ethical committee approval (Comités de Protection des Personnes, Nord Ouest IV de Lille, France; number EudraCT / ID-RCB 2020-A01253-36). All participants gave their informed consent. Blood was sampled in 10 mL EDTA tubes and plasma was stored at – 80 °C. Age, gender, body mass index (BMI) and comorbidities were collected for all participants. All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

### ***2.2. Analysis of lipoprotein subpopulations with tube gel electrophoresis (Quantimetrix Lipoprint)***

The different LDL subpopulations separated according to their size were determined using the Lipoprint® LDL Quantimetrix kit (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). The Lipoprint LDL system is an FDA-validated test for the measurement of lipoprotein subpopulations by their cholesterol content for research and clinical diagnosis. The Lipoprint LDL system is based on a native 3% polyacrylamide gel tube [14]. Experimentation and analysis of Lipoprint LDL tubes were carried out following the manufacturer's protocol. Briefly, 25 µL of plasma were mixed with 200 µL of loading buffer and deposited on top of the gel tube. The

loading gel was then photopolymerized for 35 min at room temperature. The gel tubes were then electrophoresed at 3 mA/gel for  $\pm$  1 h or until the migration front was 1 cm from the end of the tube. The tubes were then allowed to rest for 30 min in the dark. The gel tubes were then scanned and analyzed using LipoWare LDL software. The lipoprotein subpopulations measurable by the LDL Lipoprint system are VLDL, three subpopulations of IDL (IDL-C, IDL-B, and IDL-A), seven subpopulations of LDL (LDL-1 to 7), and HDL. Concerning LDL, they are grouped into two large subpopulations: large LDL corresponding to the sum of LDL-1 to 2 and small LDL corresponding to the sum of LDL-3 to 7. The results are expressed as a percentage of total cholesterol.

### **2.3. LDL isolation from plasma**

All the following steps were performed under a class II microbiological safety bench. Lipoproteins were isolated from EDTA-plasma via two-steps ultracentrifugation as described previously [15]. Briefly, the density of plasma was adjusted to 1.063 using potassium bromide (KBr) solution of density 1.35: 99  $\mu$ L of KBr solution ( $d=1.35$ ) was spiked to 500  $\mu$ L of plasma. This plasma ( $d=1.063$ ) was underlaid with 1 mL of KBr solution ( $d=1.063$ ). The 2 mL UltraClear centrifuge tube was then completed with 300  $\mu$ L of KBr solution ( $d=1.063$ ). Ultracentrifugation was performed at 45,000 rpm for 20 h at 10°C in a 50.4 Ti rotor with Beckman Coulter Optimal L-80 XP ultracentrifuge. The upper lipoprotein fraction containing lipoproteins with a density of less than 1.063, including LDL, was recovered (150  $\mu$ L). This fraction will be referred to as LDL in the following. LDL was washed 4 times with saline buffer (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.025% NaN<sub>3</sub>, pH 7.3) to remove KBr and was concentrated to 100 microliters using a centrifugal filtration device (Amicon Ultra, 3 kDa cut-off, UFC500396)

### **2.4. Label-free Quantification by Nano LC-MS/MS analysis**

Label-free protein quantification was performed on LDL fractions obtained from 8 patients with severe COVID-19 and 16 age- and sex-matched controls, healthy subjects (2 controls / 1 patient).

#### **2.4.1. LDL sample preparation and proteolytic digestion**

The total protein concentration of LDL was quantified by BCA assay, using bovine serum albumin as the standard range. Briefly, 3  $\mu$ g of the LDL fraction was mixed with 300  $\mu$ L of digestion buffer (50 mM ammonium bicarbonate) and then, reduced for 20 min at 60°C in with 20 mM dithiothreitol. Alkylation of the samples was performed for 30 min in the dark with 40 mM iodoacetamide. Then, LDLs were digested with trypsin-tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK treated, Sigma) overnight at 37°C then, the digestion was stopped with 20% trifluoroacetic acid (TFA) and the samples were incubated 15 min at 4°C. Samples were centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 10°C and digested peptides in the supernatant were desalted on Pierce peptide desalting spin columns (Thermo Fisher Scientific, part number 2162704). The peptides were eluted with 40% acetonitrile (ACN) with 0.1% TFA and dried by Speed Vacuum. Dried peptides were resuspended in 4% ACN with 0.1% TFA, concentrated, and purified on Pierce C18 tips (Thermo Fisher

Scientific, reference 87782). Finally, 20  $\mu\text{L}$  of 40% ACN with 0.1% TFA was used to elute the peptide and then dried under vacuum at 60°C before mass spectrometry analysis.

#### 2.4.2. Nano LC-MS/MS method

The method was carried out with two solvents, solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN). Digested peptides were solubilized in 7  $\mu\text{L}$  of 4% ACN with 0.1% TFA. Mass spectrometry analysis was performed by nano-LC on a Thermo Fisher Ultimate 3000 Series NCS-3500 RS coupled to a nanospray ionization (NSI)-Q-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) [12]. Briefly, 5  $\mu\text{L}$  of samples were injected into a C18 LC-EASY-spray column (2.6  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ , 75  $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$ , Thermo Fisher Scientific). Two linear peptide elution gradients were used: one ranging from 4 to 27.5% solvent B for 127 min, and the second from 27.5 to 48% solvent B for 18 min. Next, the column was washed with 90% solvent B for 5 min and equilibrated with 4% solvent B for 25 min. During these steps, the column was heated to 40°C and the flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer was set with the following conditions: spray voltage of 2 kV, capillary temperature heated to 275°C and S-lens RF level at 30%. Mass spectra were generated with XCalibur software (version 4.2.47, Thermo Fisher Scientific) and recorded in data-dependent acquisition with the mass spectrometer operating in a positive mode. The full scan mass spectrum was defined in the range of 350 to 2000 m/z with a resolving power of 70,000 (at m/z 400) with an automatic gain control (AGC) target of  $1\text{e}6$  and a maximum injection time (max IT) of 120 ms. The top 10 precursors were screened for MS/MS spectra with a resolution of 17,500 (at m/z 400), an AGC target of  $1\text{e}5$  and a max IT of 64 ms. Peptide fragments were obtained by higher energy collisional dissociation (HCD, 28% normalized collision energy). Dynamic exclusion was applied with a repeat duration of 60 s. Charge state filtering was activated, and precursors with unknown or 1+ charge states were screened out. The Orbitrap performance was checked weekly, and an external calibration of the mass spectrometer was performed pre-assay with LTQ ESI positive ion calibration solution (Pierce).

#### 2.4.3. Protein identification and quantification

Protein identification and quantification were performed automatically from the raw files with Proteome discoverer software (version 2.2.2.0). MS and MS/MS spectra were compared to the Uniprot Human reference proteome database containing only canonical sequences (22,657 sequences; August 17, 2020) using the SEQUEST HT search engine. The following features were defined in SEQUEST HT for identification: variable modifications are methionine oxidation and N-terminal acetylation of proteins, then, a fixed modification sets the carbamidomethylation of proteins and the specific enzyme selected is trypsin with two miscleavage allowed. A mass tolerance of 10 ppm for precursor ions and 0.02 Da for-product ions was used in SEQUEST HT. A decoy database search strategy with target inversion was applied with a false discovery rate set at 1% for proteins and peptides. Then, only proteins with at least one unique peptide with a Sequest Score (Xcorr)  $\geq 1.5$  were used and for Xcorr  $< 1.5$ , manual verification of peptide identification was performed

on the MS/MS spectrum. Identified peptides were quantified by label-free using the peak intensity of a validated peptide (unique and razor) for a given protein. After quantification, all proteins with more than 60% missing value were not taken into account in the analysis. For proteins with  $\leq 60\%$  missing values, they were replaced by the 25<sup>th</sup> percentile of the corresponding proteins in the respective groups. The list of identified and quantified proteins and peptides is available in the **supplemental table S1**.

#### 2.4.4. Data processing

Proteome discoverer (version 2.2.2.2.0) was used to perform the calculations. Protein abundance is the average of the protein intensities of all samples for each group (severe COVID-19 vs. Control). Protein intensity was defined as the sum of the protein-peptide intensities considered for each individual. The protein intensity values were transformed in log<sub>2</sub>. Log<sub>2</sub> (Fold Change) is defined as the logarithm in base 2 of the difference between the mean intensities of a given protein in COVID-19 patients and the mean intensities of that same protein in controls. Abundance ratio was defined as the ratio of the average LDL protein intensity in severe COVID-19 patients divided by the average intensity of the same protein in LDL of controls. Finally, Log (2) was calculated to present the difference between groups.

#### **2.5. Western Blot analysis**

Western blots were done using an SDS-PAGE gel (12% polyacrylamide) to separate LDL proteins. 5  $\mu$ g of the LDL fraction were electrophoresed and then transferred to a nitrocellulose membrane as previously described [12]. Following the transfer, the presence of proteins was checked by Ponceau red staining. The following antibodies were used: clusterin (Abcam, ab69644, used at 1:1,000), apolipoprotein A-1 (Origene, AP14057PU-N used at 1:10,000), alpha-1 antitrypsin (Calbiochem, catalog no. 178260, used at 1:1,000) and serum amyloid A-I (Abcam, ab190802, 1:4,000).

#### **2.6. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed with Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Shapiro Wilk test was carried out on the data to check the data normality. Then, a Mann-Whitney test or an unpaired t-test was performed when appropriate to compare COVID-19 patients versus controls.



### 3. Results

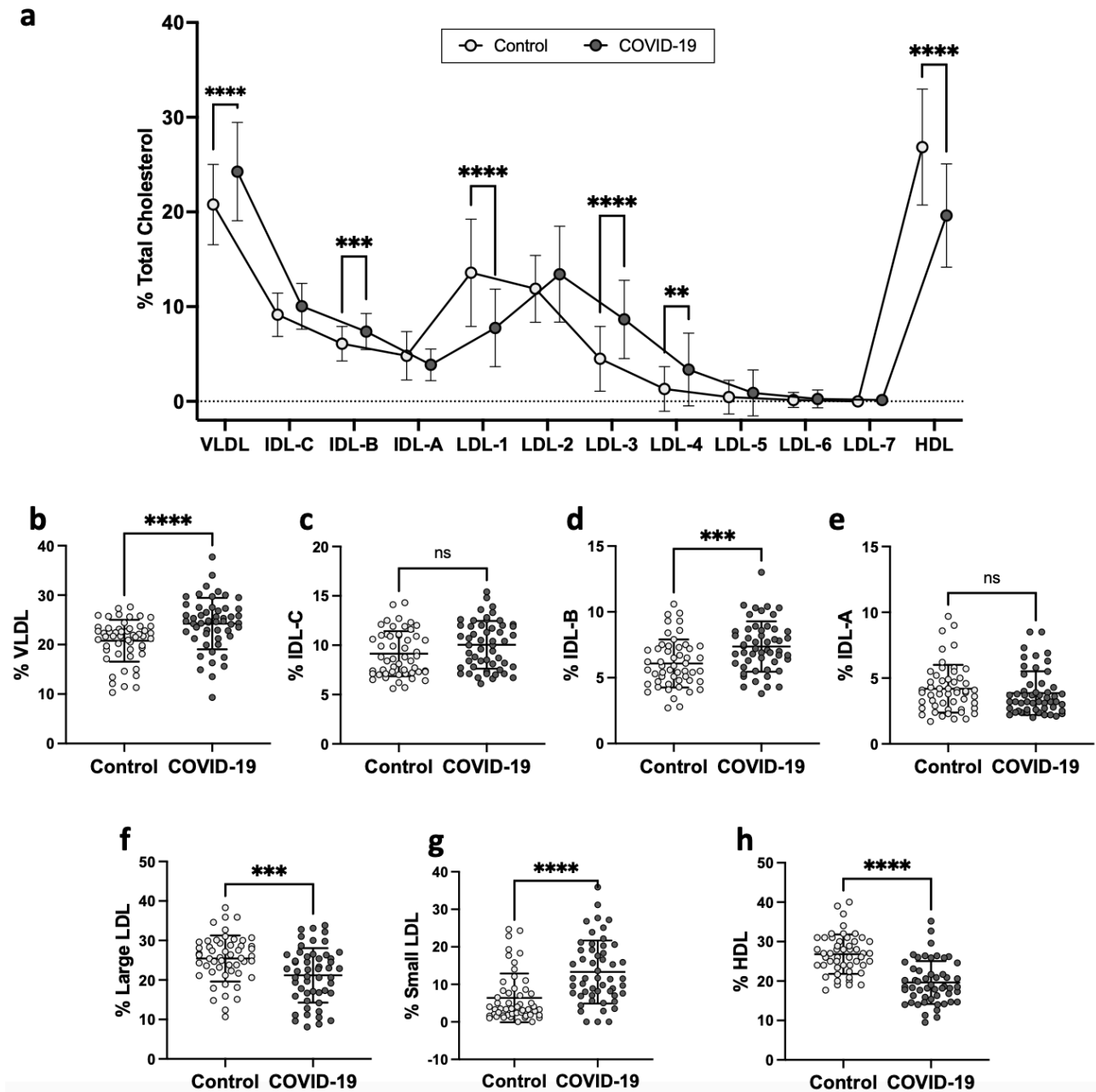
#### 3.1. Study population

Table 1. Characteristics and outcome of COVID-19 patients.

Characteristics	COVID-19 (n=52)	Control (n=52)	p-value
Age, years, median [IQR]	60 [51-69]	51 [46-57]	<0.0001
Male sex, n (%)	37 (71)	37 (71)	>0.9999
BMI, kg/m <sup>2</sup> , median [IQR]	30 [26-32]	24 [22-27]	<0.0001
<b>Comorbidities</b>			
High blood pressure, n (%)	18 (35)	8 (15)	0.0403
Diabetes mellitus, n (%)	7 (13)	0 (0)	<0.0001
<b>Timing of hospitalization</b>			
Between first symptoms and hospitalization (days)	6 [4-9]		
Between hospitalization and ICU admission (days)	1 [0-2]		
<b>Severity scores at admission</b>			
SAPS-II, median [IQR]	36 [26-46]		
SOFA score, median [IQR]	4 [3-5]		
<b>Treatments during ICU stay</b>			
Norepinephrine, n (%)	8 (15)		
Mechanical ventilation, n (%)	21 (40)		
Length of mechanical ventilation, median [IQR]	0 [0-12]		
Days alive without MV at day 28, median [IQR]	26 [5-28]		
Prone positioning, n (%)	14 (27)		
Tracheostomy, n (%)	4 (8)		
ECMO, n (%)	4 (8)		
RRT, n (%)	4 (8)		
<b>COVID-19 specific treatments</b>			
Tocilizumab, n (%)	3 (6)		
Remdesivir, n (%)	1 (2.5)		
Corticosteroids, n (%)	46 (88)		
<b>Outcome</b>			
ICU LOS (days), median [IQR]	7 [4-11]		
Hospital LOS (days), median [IQR]	10 [7-26]		
Mortality at day-28, n (%)	13 (25)		
<b>Lipid profiles</b>			
Total cholesterol, mmol/L, median [IQR]	3.61 [2.86-4.38]	5.10 [4.53-5.60]	<0.0001
Triglycerides, mmol/L, median [IQR]	1.85 [1.29-2.43]	1.00 [0.80-1.50]	<0.0001
LDL-C, mmol/L, median [IQR]	2.30 [1.57-2.82]	3.30 [2.73-3.93]	<0.0001
HDL-C, mmol/L, median [IQR]	0.79 [0.53-1.02]	1.46 [1.29-1.70]	<0.0001

Abbreviations: ECMO: extracorporeal membrane oxygenation; ICU: intensive care unit; LOS: length of stay; RRT: renal replacement therapy; SAPS-II: simplified acute physiology score-II; SOFA: Sepsis-related Organ Failure Assessment, HDL-C, High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, Low-density lipoprotein cholesterol.

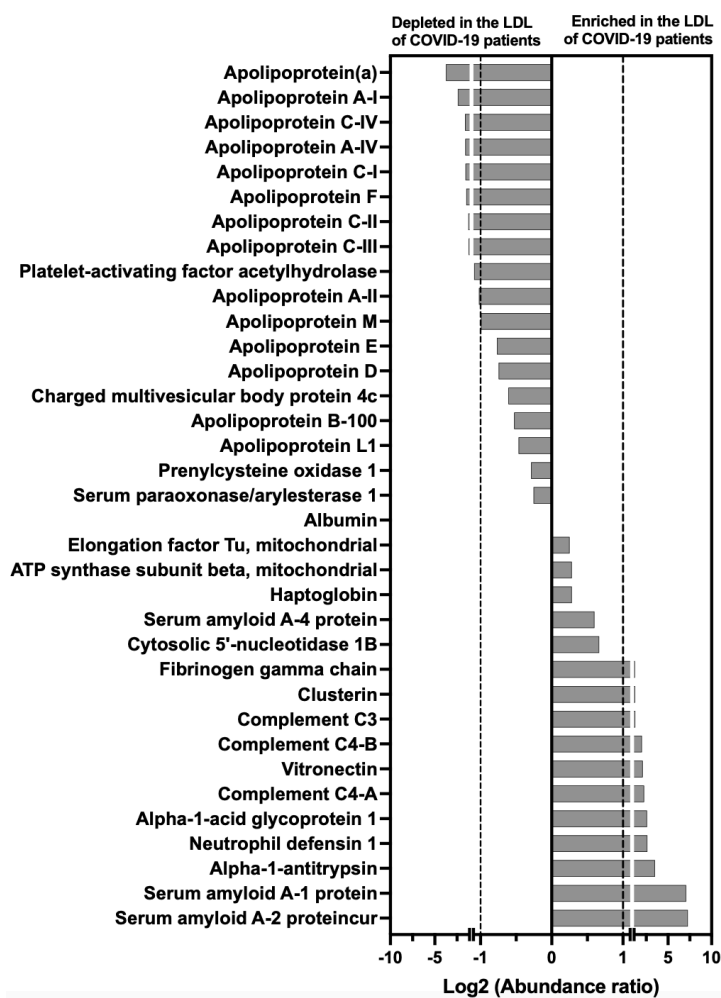
### 3.2. LDL particle size analysis by Lipoprint LDL system



**Figure 1. Changes in lipoprotein subpopulations during severe COVID-19.** Lipoprotein subpopulations were measured from the plasma of control subjects (n=52) and severe COVID-19 patients (n=52) using the Lipoprint LDL Quantimetrix kit. **(a)** Lipoprotein profiles of plasma from a control subject and a severe COVID-19 patient obtained after analysis with Lipoware LDL software. Distribution of different lipoprotein subpopulations by increasing density: VLDL **(b)**, IDL **(c-e)**, LDL (large **(f)** and small **(g)**), and HDL **(h)** in plasma of control subjects versus severe COVID-19 patients. Each point is expressed as a percentage of total cholesterol contained in lipoproteins. Graphs represent the mean  $\pm$  standard deviation of the percentage of total cholesterol detected in lipoproteins. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , and \*\*\*\*  $p < 0.0001$  compared with the control group.

In severe COVID-19 patients, an altered lipid profile is observed, characterized by elevated triglyceride levels, and low levels of total cholesterol, HDL-C, and LDL-C relative control subjects (**Table 1**). Given that lipoprotein size is associated with their property and/or functionality [16, 17], non-denaturing, non-reducing electrophoresis was performed to measure the different LDL subpopulations in 52 COVID-19 patients and 52 control subjects. An alteration of the lipoprotein profile was observed in COVID-19 patients compare to control (**Figure 1. a**). The percentages of VLDL, IDL-B and small LDLs were significantly higher in COVID-19 patients, whereas large LDLs and HDLs are significantly lower in COVID-19 patients compared with the control group (**Figure 1. b-h**). In addition, the mean LDL size of COVID-19 patients was smaller than that of controls (257 vs. 266,  $p < 0.0001$ ).

### 3.3. Proteomics analysis comparing LDL from COVID-19 versus controls

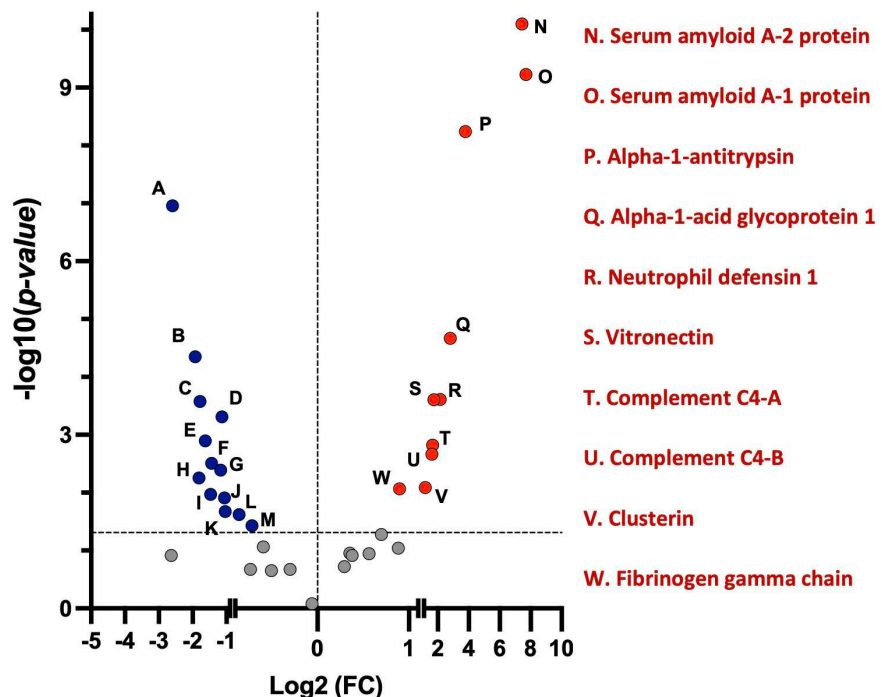


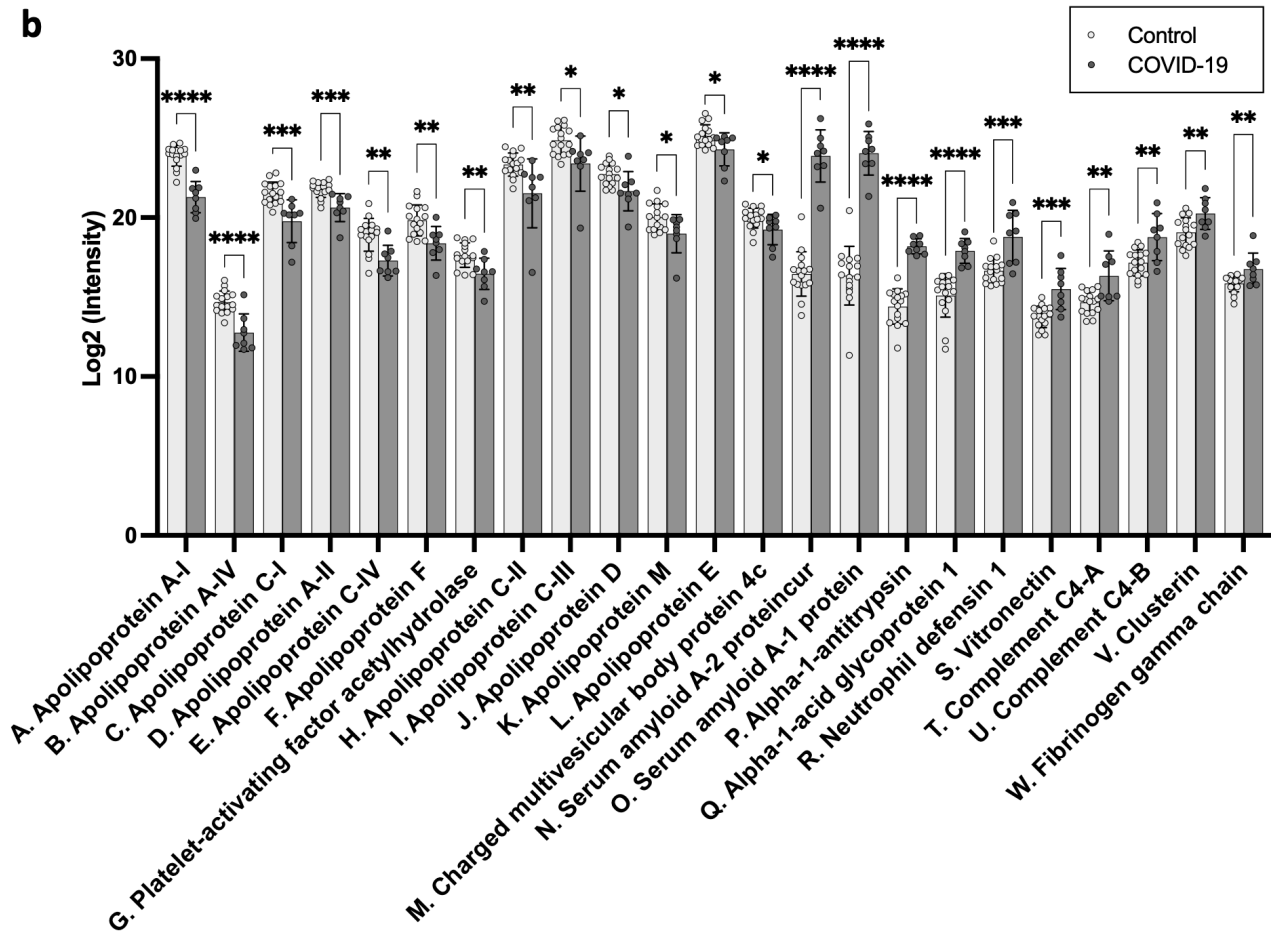
**Figure 2. Relative abundance of identified and quantified proteins in LDL isolated from plasma of COVID-19 patients and controls.** The LDL fraction was isolated from control (n=16) and severe COVID-19 (n=8) plasma samples by ultracentrifugation. Log2 (abundance ratio) is defined as the logarithm of the abundance ratio of LDL protein intensities in severe COVID-19 patients divided by the LDL protein intensities in controls in base 2.

LDL from 8 patients with severe COVID-19 and 16 age and sex-matched controls were prepared for shotgun proteomics analysis. Tryptic peptides obtained from 3  $\mu$ g total LDL protein were then analyzed by NanoLC-tandem mass spectrometry. MS/MS spectra were queried in the Uniprot Human database using the Sequest HT search engine. A first analysis of MS/MS spectra by proteome discoverer software allowed the identification of 52 proteins in the LDL fraction from COVID-19 patients and controls (**Supplemental Table S1**). Among these proteins, 35 proteins were determined to be effectively associated with LDL of COVID-19 patients and controls according to more stringent inclusion criteria allowing a high degree of confidence of association of these proteins to LDL. ( $\geq 1$  unique peptide with a Sequest Score (Xcorr)  $\geq 1.5$  or with a manual verification of peptide identification, a q-values  $\leq 0.01$  and  $\leq 60\%$  missing value in each group). In order to compare COVID-19 and control groups, a fold change analysis of LDL-associated protein intensities was performed prior to their transformation into log 2. Among the 35 proteins identified, the relative abundance of 10 proteins was decreased in COVID-19 vs control LDLs: apolipoproteins (apo) (a), apo A-I, apo C-IV, apo A-IV, apo C-I, apo F, apo C-II, apo C-III, platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) and apo A-II. In contrast, the LDL fraction of COVID-19 patients was enriched with 11 proteins: serum amyloid A-2 and -1 (SAA), alpha-antitrypsin (AAT), neutrophil defensin 1, alpha-1-acid glycoprotein 1 (AGP-1), complement C4 A and B, C3, vitronectin, clusterin (apo J), and fibrinogen gamma chain (**Figure 2**).

**a**

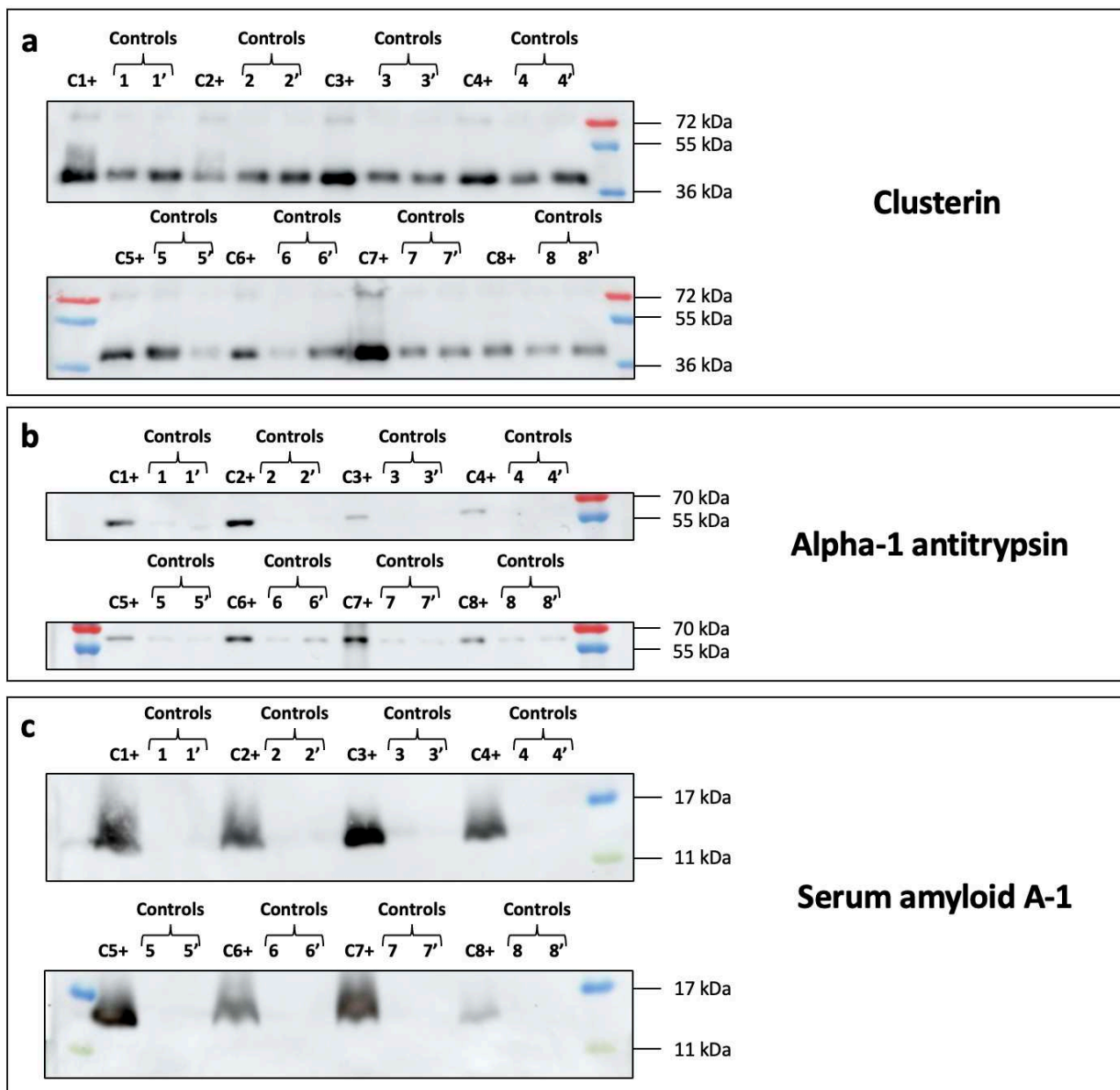
- A. Apolipoprotein A-I
- B. Apolipoprotein A-IV
- C. Apolipoprotein C-I
- D. Apolipoprotein A-II
- E. Apolipoprotein C-IV
- F. Apolipoprotein F
- G. Platelet-activating factor acetylhydrolase
- H. Apolipoprotein C-II
- I. Apolipoprotein C-III
- J. Apolipoprotein D
- K. Apolipoprotein M
- L. Apolipoprotein E
- M. Charged multivesicular body protein 4c





**Figure 3. Alterations in the LDL proteome in patients with COVID-19.** The LDL fraction was isolated by ultracentrifugation from control (n=16) and COVID-19 (n=8) plasma samples. The LDL proteome was determined by shotgun analysis using Nano LC-MS/MS. Volcano plot and a bar graph of the different proteins altered in the LDL proteome of COVID-19 patients compared to control are represented. **(a)** For the volcano plot the blue dots correspond to the decreased proteins in COVID-19 relative to control and in red the increased proteins in COVID-19 compared with control. **(b)** Bar graph of the intensities of each protein and patients obtained by Nano LC-MS/MS analysis and transformed into Log2. The bar graphs represent the mean Log2 (Intensity) of the protein in LDL  $\pm$  SD of both groups. Each point represents the Log2 (Intensity) of the protein in LDL of each patient. An unpaired t test is used (control vs. COVID-19). \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.0001$ , and \*\*\*\*  $p<0.0001$  compared with the control group.

Statistical analyses were performed on the base-2 log-transformed intensities of the 35 LDL-associated proteins. Among these 35 LDL-associated proteins, a modulation of the concentration of 23 of these proteins was observed between COVID-19 patients and controls (**Figure 3**). The 13 proteins were identified as being less abundant in the LDL of COVID-19 patients as apolipoproteins (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, C-IV, E, F), PAF-AH and charged multivesicular body protein 4c. Other proteins were determined to be more abundant in the LDL fraction of COVID-19 patients, namely SAA-1, SAA-2, AAT, AGP-1, neutrophil defensin 1, vitronectin, complement C4 A and B, apo J and fibrinogen gamma chain (**Figure 3. b**).



**Figure 4. Western blot analyses confirm the variation of protein abundance in LDL isolated from plasma of control and severe COVID-19 patients.** The LDL fraction was isolated by ultracentrifugation from control (n=16) and severe COVID-19 (n=8) plasma samples. 5  $\mu$ g of LDL was loaded per lane, blotted, and analyzed with specific antibodies against clusterin **(a)**, alpha-1 antitrypsin **(b)**, and serum amyloid A-1 **(c)**.

Western blot analyses were performed on some proteins to confirm mass spectrometric identification and changes in protein abundance in LDL from COVID-19 patients and controls. The targeted proteins were clusterin (Apo J), AAT, and SAA-1 (**Figure 4**). The presence and high abundance of clusterin and AAT were strongly associated with LDL from COVID-19 patients relative to controls (**Figure 4. a, b**). SAA-1, an acute phase protein that associates with lipoproteins during infection, was abundantly present in the LDL of COVID-19 patients vs controls (**Figure 4. c**).

#### 4. Discussion

In our study, we evaluated the changes in lipid profile, size of non-HDL plasma lipoprotein fractions (VLDL, IDL and LDL) and the alteration of the proteome of these fractions in patients with severe COVID-19. We observed that the lipid profile of patients with severe COVID-19 was altered compared to that of age- and sex-matched healthy subjects, characterized by low levels of TC, LDL-C, HDL-C and high levels of TG. In addition, our study highlighted that the percentages of VLDL, IDL-B and small LDL fractions were higher in patients with severe COVID-19 while the levels of large LDL and HDL are low compared to healthy subjects by the LDL Lipoprint technique. Finally, we show an alteration of the LDL proteome of COVID-19 patients.

Our findings corroborate previous studies by our team and others, demonstrating that COVID-19 patients exhibit low levels of TC, LDL-C, and HDL-C [5, 6, 12, 18]. We confirm that TC, HDL-C, LDL-C levels are lower than baseline while TGs are higher in COVID-19 patients in intensive care [12]. Furthermore, it has been reported that TC, HDL-C and LDL-C levels are negatively correlated with the severity, mortality of COVID-19 independently of comorbidities factors [18]. The COVID-19 patients in our study have a similar lipid profile to patients with bacterial sepsis who also have increased TG and decreased levels of TC, LDL-C, HDL-C [19, 20]. Therefore, these changes in lipid profile are not specific to SARS-CoV-2 infection.

The majority of lipid studies during COVID-19 are based on the classical lipid profile (LDL-C, HDL-C, TG, TC) in which LDL-C is a calculation or quantitative measure of the cholesterol present in these lipoproteins [21]. Our study is the first to investigate the distribution of cholesterol in the different lipoprotein subpopulations (VLDL, IDL, LDL and HDL) separated according to their size by electrophoresis. The Lipoprint LDL is a non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis allowing the separation of LDL into 7 sub-fractions according to their size. Pattern A corresponds to large LDL (LDL-1 to 2) and pattern B corresponds to small and dense LDL (LDL-3 to 7). This classification was verified by other techniques such as NMR and non-denaturing gradient gel electrophoresis [14].

Elevated levels of small and dense LDL (sdLDL) have already been proposed as biochemical markers of predisposition to cardiovascular disease [22, 23]. These high levels of sdLDL increase the risk of developing cardiovascular disease by a factor of three in combination with an atherogenic lipid profile defined by high TG and low HDL-C levels [24]. Multiple studies have measured sdLDL using the Lipoprint LDL technique and have shown the link between high levels of measured sdLDL and the development of cardiovascular disease [22, 25–27]. Through this technique, we measured increased levels of VLDL and small LDL and low levels of HDL and large LDL in our COVID-19 patients. This profile is similar to that identified in patients who are at risk and have developed cardiovascular disease [22, 27].

In addition to the changes in lipid profile common to different infections, changes in the size of lipoprotein subpopulations have been observed during some infections. Indeed, in patients with mononucleosis caused by EBV infection compared with controls, an increase in sdLDL levels determined by Lipoprint LDL has been reported [28], as observed in our study.

In the NIH LipoCOVID study [7], lipoprotein subpopulations were characterized by NMR using NMR LipoProfile analysis in 32 patients with severe COVID-19. They report low levels of large and medium LDL while small LDL particles are dominant in these COVID-19 patients. Like Ballout et al., we observe significantly low levels of HDL and large LDL, as well as high levels of small LDL in COVID-19 ICU patients.

Another study using NMR (IVDR B.I. LISA module) [29] showed a decrease in the levels of HDL, LDL-1 and LDL-3 (large particles), as well as an increase in VLDL in COVID-19 patients compared with healthy subjects. Thus, despite the difference in technique, this study confirms a shift towards small particle size LDL in COVID-19 patients. In our study no difference was observed in the subgroups BMI < 25 vs BMI > 25. This lack of difference may be due to the differences in numbers between the BMI > 25 (n=43) and BMI < 25 (n=9) groups. In addition, no difference was observed between survivors vs non-survivors, probably due to the small number of subgroups.

Also, in our previous study, we were able to show on a severe COVID-19 patient that when the patient was on CER-001 (reconstituted HDL particles) supplementation, a decrease in sdLDL levels was observed whereas as soon as the treatment was stopped an increase in sdLDL level was shown [30].

Given the alterations observed in lipoprotein subpopulations, we focused our investigation on the LDL proteome of COVID-19 patients. Additionally, our previous research demonstrated that severe COVID-19 patients not only exhibit quantitative changes in HDL-C levels but also altered composition of these nanoparticles, as well as a loss of endothelial protective function during COVID-19, which were evident from the time of their admission to the ICU [12]. LDL and HDL may share some proteins [31]. Here, we have shown that the LDL proteome of COVID-19 patients is altered and shows common changes observed in the HDL of these COVID-19 patients. Indeed, an increase in acute phase proteins is observed in the LDL proteome of patients including serum amyloid A (SAA) 1 and 2, alpha acid glycoprotein and alpha-anti-trypsin. SAA-1 and SAA-2 are apolipoproteins whose production is increased in the liver during the acute phase of a viral or bacterial infection. Circulating SAA is mostly associated with HDL but also with LDL and VLDL [32].

At the beginning of the COVID-19 epidemic, SAA was suggested as a biomarker of COVID-19 severity; indeed, SAA levels are higher in non-surviving patients compared to survivors [33, 34]. The increased circulating SAA in COVID-19 patients may facilitate platelet adhesion via  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  integrin at the vessel level and thus increase the risk of thrombosis in COVID-19 [35]. Alpha-1-antitrypsin or SERPINA1 is found associated with LDL and HDL; here AAT is increased in the LDL of COVID-19 patients. AAT is the circulating inhibitor of neutrophil elastase, which modulates its proteolytic activity, particularly during infection [36]. These elevated SERPINA1 levels were also observed in COVID-19 patients with high IL-6 [37]. Increased SAA and AAT in LDL were also confirmed by Western blot. We were able to demonstrate the increase in other proteins in the LDL fractions of COVID-19 patients, such as C4A and C4B complements. These complement proteins may participate in the increased coagulation cascades during COVID-19. In addition, elevated levels of neutrophil defensin-1, a protein contained in neutrophil granules with antimicrobial activity, have been observed in LDL from patients with COVID-19. Previous studies have shown an increase in the activation cascade of the complement system



and neutrophil degranulation during COVID-19, suggesting that disruption of these processes leads to severe forms and/or death [37–39]. In our previous study, a decrease in Apo J (clusterin) was observed in the HDL of COVID-19 [12]. In our study, we observed an increase of clusterin in LDL from COVID-19 ICU patients. This protein is known to bind to scavenger receptors on macrophages as well as to the LDL receptor related protein family, allowing its internalization and subsequent proapoptotic effect within the cell [40]. The proteomic results were confirmed by Western blot in our study. The abundance of SAA, AAT, and clusterin were significantly higher in the LDL of COVID-19 patients than in the control group.

In our study, we identified that 10 apolipoproteins that were decreased in the LDL fraction of COVID-19 patients. Some of these apolipoproteins were previously reported to be decreased in the plasma of COVID-19 patients, including Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III and Apo E [38, 39, 41, 42]. Apo A-I has previously been detected in LDL by mass spectrometry [43]. In addition, the association of apolipoprotein A-I in LDL was also verified by Western blot (**Supplemental Figure S2**), confirming the lower levels of Apo A-I in COVID-19 patients relative to the control group. Apo A-IV, Apo (a), Apo E and PAF-AH decreased in LDL of COVID-19 patients are proteins that participate in lipoprotein remodeling. Some apolipoproteins such as Apo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-III, Apo A-II, Apo F play a role in lipid transport and lipid metabolism.

## **5. Limitation of the study**

Our study has several limitations, among which is that it is a single-center study performed at a single time point during admission to the ICU of COVID-19 patients. In addition, the lack of follow-up data for these patients precludes any assessment of changes in their lipoprotein profiles over time. Another limitation is the relatively small number of samples analyzed for the proteomic study. However, previous studies have shown that the statistical power is sufficient to detect significant differences between severe COVID-19 patients and healthy controls, even with a small sample size. In addition, we focused only on pro-atherogenic lipoproteins with a density of less than 1.063, which represent a heterogeneous fraction including not only LDL but also other lipoproteins such as VLDL and IDL. This option was chosen to minimize the risk of oxidation by using a one-step ultracentrifugation method to isolate this fraction.

## **6. Conclusion**

Our study is the first to investigate the size of LDL subpopulations using LDL Lipoprint electrophoresis and to analyze the proteome of the LDL fraction in severe COVID-19 patients. Our findings indicate that COVID-19 patients have decreased levels of LDL-C, HDL-C, and TC, and that their lipoprotein profile is characterized by low levels of large LDL, IDL-B, and HDL, as well as high levels of VLDL and small LDL, compared to healthy individuals. Additionally, our study revealed that the LDL proteome of COVID-19 patients was enriched in acute phase proteins and decreased in certain apolipoproteins that may impact lipid metabolism. These

results highlight the importance of further investigating these lipoprotein profiles as potential prognostic or stratifying markers in COVID-19 patients, and monitoring their changes over time to assess their potential atherogenicity and vulnerability to cardiovascular complications.

## **7. Acknowledgments**

FB is financed by a grant from the Région Réunion for their PhD (European Union-Reunion Region). MLA is the laureate of a PhD scholarship awarded by the *Université de La Réunion* and funded by the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France). The sponsors of the LIPICOR and H-COV-RUN studies were respectively Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation) and CHU de La Réunion. We thank Nicolas Bouscaren, Maxime Cournot and Lucie Auzanneau for their help in methodology and project management (H-COV-RUN study).

## **8. Ethics approval and consent to participate**

Patients admitted for severe COVID-19 pneumonia were consecutively and prospectively included in the LIPICOR “LIPid profile changes in Inflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2” study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05113836). This study was approved by the appropriate French ethics committee (Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV, ID-RBC: 2020-A02638-31, approved on 07/12/2020). Written informed consent was obtained from each patient.

Control plasma from healthy volunteers were sampled from caregivers of the University Hospital Center of Reunion Island (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04384705), after obtaining ethical committee approval (Comités de Protection des Personnes, Nord Ouest IV de Lille, France; number EudraCT / ID-RCB 2020-A01253-36).

## **9. Availability of data and materials.**

Not applicable.

## **10. Funding**

FB is financed by a grant from the Région Réunion for their PhD (European Union-Reunion Region). This research was funded by FEDER "LIPICOR" RE0027600 (EU—Région Réunion—French State national counterpart), and by the BIOST Fédération.

## **11. Authors' contributions**

OM, DC and ST designed the study. FB, BV, MLA acquired the data. FB, OM, ST analyzed the data. BV, ZM participated in the development of the mass spectrometry method. BL-J, EA, NZ, MLX participated in the

patient inclusions and biochemical analyses with supervision ST and PM. FB, ST, OM wrote the manuscript. PR, PM, PM, OM critically reviewed the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## 12. Conflicts of interests

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose

## 13. References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733
2. Arish M, Qian W, Narasimhan H, Sun J (2022) COVID-19 immunopathology: From acute diseases to chronic sequelae. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.28122>
3. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC (2020) Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* 324:782–793
4. Feingold KR (2000) Introduction to Lipids and Lipoproteins. *Endotext*
5. Fan J, Wang H, Ye G, Cao X, Xu X, Tan W, Zhang Y (2020) Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metabolism* 107:154243
6. Hu X, Chen D, Wu L, He G, Ye W (2020) Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clinica Chimica Acta* 510:105–110
7. Ballout RA, Kong H, Sampson M, Otvos JD, Cox AL, Agbor-Enoh S, Remaley AT (2021) The NIH Lipo-COVID Study: A Pilot NMR Investigation of Lipoprotein Subfractions and Other Metabolites in Patients with Severe COVID-19. *Biomedicines* 9:1090
8. Feng Q, Wei W-Q, Chaugai S, et al (2019) Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels and Risk for Sepsis Among Patients Admitted to the Hospital With Infection. *JAMA Network Open* 2:e187223
9. Tanaka S, Tymowski CD, Assadi M, et al (2020) Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLOS ONE* 15:e0239573
10. Herbert KE, Erridge C (2018) Regulation of low-density lipoprotein cholesterol by intestinal inflammation and the acute phase response. *Cardiovascular Research* 114:226–232
11. Huang W, Li C, Wang Z, Wang H, Zhou N, Jiang J, Ni L, Zhang XA, Wang D-W (2020) Decreased serum albumin level indicates poor prognosis of COVID-19 patients: hepatic injury analysis from 2,623 hospitalized cases. *Sci China Life Sci* 63:1678–1687
12. Begue F, Tanaka S, Mouktadi Z, et al (2021) Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Sci Rep* 11:2291
13. Catapano AL, Graham I, De Backer G, et al (2016) 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 37:2999–3058

14. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, McConnell JP (2001) Development of a Rapid, Quantitative Method for LDL Subfractionation with Use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem* 47:266–274
15. Ortiz-Munoz G, Couret D, Lapergue B, Bruckert E, Meseguer E, Amarenco P, Meilhac O (2016) Dysfunctional HDL in acute stroke. *Atherosclerosis* 253:75–80
16. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH (1984) Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *Journal of Lipid Research* 25:1277–1294
17. Krauss RM (2010) Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk. *Current Opinion in Lipidology* 21:305–311
18. Sampedro-Nuñez M, Aguirre-Moreno N, García-Fraile Fraile L, Jiménez-Blanco S, Knott-Torcal C, Sanz-Martin P, Fernández-Jiménez G, Marazuela M (2021) Finding answers in lipid profile in COVID-19 patients. *Endocrine* 74:443–454
19. Tanaka S, Labreuche J, Drumez E, Harrois A, Hamada S, Vigué B, Couret D, Duranteau J, Meilhac O (2017) Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Ann Intensive Care* 7:60
20. Tanaka S, Stern J, Bouzid D, et al (2021) Relationship between lipoprotein concentrations and short-term and 1-year mortality in intensive care unit septic patients: results from the HIGHSEPS study. *Annals of Intensive Care* 11:11
21. Wolska A, Remaley AT (2020) Measuring LDL-cholesterol: What is the best way to do it? *Curr Opin Cardiol* 35:405–411
22. Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, Shinohara K, Kimoto E, Koyama H, Emoto M, Nishizawa Y (2009) Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentration and carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 202:582–588
23. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN (2017) Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017:1273042
24. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM (1990) Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 82:495–506
25. Rizzo M, Pernice V, Frasheri A, Di Lorenzo G, Rini GB, Spinaz GA, Berneis K (2009) Small, dense low-density lipoproteins (LDL) are predictors of cardio- and cerebro-vascular events in subjects with the metabolic syndrome. *Clinical Endocrinology* 70:870–875
26. Duan R, Xue W, Wang K, Yin N, Hao H, Chu H, Wang L, Meng P, Diao L (2020) Estimation of the LDL subclasses in ischemic stroke as a risk factor in a Chinese population. *BMC Neurol* 20:1–9
27. Pan Z, Guo H, Wang Q, Tian S, Zhang X, Li C, Ma Z (2022) Relationship between subclasses low-density lipoprotein and carotid plaque. *Transl Neurosci* 13:30–37
28. Apostolou F, Gazi IF, Lagos K, Tellis CC, Tselepis AD, Liberopoulos EN, Elisaf M (2010) Acute infection with Epstein–Barr virus is associated with atherogenic lipid changes. *Atherosclerosis* 212:607–613
29. Kimhofer T, Lodge S, Whiley L, et al (2020) Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection. *J Proteome Res* 19:4442–4454

30. Tanaka S, Begue F, Veeren B, et al (2022) First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation. *Biomedicines* 10:754
31. Singh SA, Miyosawa K, Aikawa M (2015) Mass spectrometry meets the challenge of understanding the complexity of the lipoproteome: recent findings regarding proteins involved in dyslipidemia and cardiovascular disease. *Expert Review of Proteomics* 12:519–532
32. Buck M, Gouwy M, Wang J, Snick J, Opdenakker G, Struyf S, Damme J (2016) Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *CMC* 23:1725–1755
33. Tjendra Y, Al Mana AF, Espejo AP, Akgun Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, Cray C (2020) Predicting Disease Severity and Outcome in COVID-19 Patients: A Review of Multiple Biomarkers. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 144:1465–1474
34. Abbas AA, Alghamdi A, Mezghani S, Ben Ayed M, Alamori AM, Alghamdi GA, Bajhmom W, Wajeeh H, Almutairi SS, Radwan WM (2022) Role of Serum Amyloid A as a Biomarker for Predicting the Severity and Prognosis of COVID-19. *Journal of Immunology Research* 2022:e6336556
35. Siman-Tov R, Shalabi R, Shlomai A, Goldberg E, Essa W, Shusterman E, Ablin JN, Caspi M, Rosin-Arbesfeld R, Sklan EH (2022) Elevated Serum Amyloid A Levels Contribute to Increased Platelet Adhesion in COVID-19 Patients. *International Journal of Molecular Sciences* 23:14243
36. Janciauskiene S, Welte T (2016) Well-Known and Less Well-Known Functions of Alpha-1 Antitrypsin. Its Role in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Other Disease Developments. *Ann Am Thorac Soc* 13 Suppl 4:S280-288
37. D'Alessandro A, Thomas T, Dzieciatkowska M, Hill RC, Francis RO, Hudson KE, Zimring JC, Hod EA, Spitalnik SL, Hansen KC (2020) Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level. *J Proteome Res* 19:4417–4427
38. Demichev V, Tober-Lau P, Lemke O, et al (2021) A time-resolved proteomic and prognostic map of COVID-19. *Cell Systems* 12:780-794.e7
39. Ciccocanti F, Antonioli M, Sacchi A, et al (2022) Proteomic analysis identifies a signature of disease severity in the plasma of COVID-19 pneumonia patients associated to neutrophil, platelet and complement activation. *Clin Proteomics* 19:38
40. Rodríguez-Rivera C, Garcia MM, Molina-Álvarez M, González-Martín C, Goicoechea C (2021) Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 134:111174
41. Shen B, Yi X, Sun Y, et al (2020) Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell* 182:59-72.e15
42. Messner CB, Demichev V, Wendisch D, et al (2020) Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. *Cell Syst* 11:11-24.e4
43. Dashty M, Motazacker M, Levels J, Vries M de, Mahmoudi M, Peppelenbosch M, Rezaee F (2014) Proteome of human plasma very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism. *Thromb Haemost* 111:518–530





# Article 4

En préparation

## **HDL proteome and apolipoproteins concentrations in severe ICU COVID-19 patients**

**Floran BEGUE**, Bryan VEEREN, Philippe RONDEAU, Aline-Marie FLORENCE, Simon JAMARD, Philippe MONTRAVERS, Sébastien TANAKA†, and Olivier MEILHAC†\* on behalf of French COVID Study Group.





# HDL proteome and apolipoproteins concentrations in severe ICU COVID-19 patients

Floran BEGUE<sup>1</sup>, Bryan VEEREN<sup>1</sup>, Philippe RONDEAU<sup>1</sup>, Aline-Marie FLORENCE, Simon JAMARD, Philippe MONTRAVERS<sup>2,3,4</sup>, Sébastien TANAKA<sup>1,3†</sup>, and Olivier MEILHAC<sup>1,5†\*</sup> on behalf of French COVID Study Group

1. INSERM, UMR 1188 Diabète Athérombose Réunion Océan Indien (DÉTROI), Université de La Réunion, 97410 Saint-Pierre de La Réunion, France
2. Université Paris Cité
3. Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Assistance, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France
4. PHERE, Physiopathology and Epidemiology of Respiratory Diseases, INSERM U1152, Paris, France
5. CHU de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France

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

† These two authors contributed equally to the work.

French COVID Study Group

**Abstract:**

**Background:** SARS-CoV-2 infection affects both lipid metabolism and lung function. The severity of the disease has been associated with reduced levels of both high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein cholesterol. Despite the crucial role that these nanoparticles play in SARS-CoV-2 infection, few studies have examined their structure during COVID-19 beyond HDL quantity.

The study aimed to assess apolipoprotein levels in COVID-19 patients who either survived or died following ICU admission. In addition, ICU survivors and non-survivors were compared for HDL particle size and proteome.

**Methods:** Between February and April 2020, our study enrolled 37 COVID-19 patients upon their intensive care unit admission. Among them, 18 survived the disease, while 19 succumbed to it. We used mass spectrometry to assess plasma levels of 14 apolipoproteins and LCAT. Additionally, we analyzed HDL subpopulation distribution by utilizing native polyacrylamide gel electrophoresis. HDL particles were isolated from both surviving and non-surviving patients using ultracentrifugation, followed by characterization of their proteomes with NanoLC-MS/MS.

**Result:** Plasma apolipoproteins, including Apo A-II, Apo Cs (I, II, III), Apo H, Apo J, Apo M, and LCAT, were decreased in patients who did not survive COVID-19. However, no alterations were noted in the distribution of HDL subpopulations in relation to mortality. HDL composition was further altered based on mortality, displaying a decline in Apo H and paraoxonase 3.

**Conclusion:** In conclusion, we have shown an alteration in plasma apolipoproteins and HDL composition between surviving COVID-19 patients and non-survivors. Some markers, such as Apo H, are more predictive than baseline lipid concentrations such as HDL-C.

**Keywords:** COVID-19, mortality, HDL particle, apolipoproteome, apolipoprotein, proteomic, Intensive care unit

## 1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, which started in Wuhan, China in December 2019, is caused by a Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection and has caused more than 6 million deaths worldwide (1, 2). COVID-19 presents a broad range of symptoms and gravity, varying from ambulatory mild disease (including asymptomatic forms) to severe cases, that may result in systemic failure and death (3, 4). Severe forms of COVID-19 are associated with a hyperinflammatory response marked by a cytokine storm resulting in excessive production of pro-inflammatory cytokines like monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1 (IL-1), and interferon  $\alpha/\beta$  (IFN $\alpha/\beta$ ). These three cytokines are closely associated with the severe form of COVID-19, although the cytokine profile of COVID-19 patients varies (5–7).

Lipoproteins are macromolecular complexes composed of apolipoproteins and lipids. Apolipoproteins regulate the lipoprotein structure, lipid transport, enzyme co-activation, and provide anti-inflammatory and antioxidant effects (8). The apolipoproteins are classified into subfamilies, including Apo A, B, C, D, E, L, F, H, M, and (a). These proteins are distributed across various lipoproteins such as low-density lipoproteins (LDL) and high-density lipoproteins (HDL). (9, 10).

During a SARS-CoV-2 infection, the concentrations of total cholesterol, LDL-cholesterol (LDL-C), and HDL-cholesterol (HDL-C) are reduced and are linked to the severity of the disease. (11–14). Interestingly, numerous studies have also shown that lipid and lipoprotein metabolism are disrupted during the acute phase of SARS-CoV-2 infection, along with other illnesses (15).

Some apolipoproteins, including Apo A-I and Apo B100, can be dosed routinely like HDL-C, LDL-C, TC. Moreover, Apo A-I, A-II, and B are present in low levels in COVID-19 patients and are linked to an increased likelihood of developing severe forms of the disease (16). In a previous study, our team found lower plasmatic concentrations of nine apolipoproteins in COVID-19 patients compared to controls (13).

Beyond quantitative changes, few studies have focused on the structure and function of HDL during COVID-19. Nonetheless, HDL possesses pleiotropic properties, including antioxidant and anti-inflammatory effects, in addition to its primary role in reverse cholesterol transport (11, 15, 17–19). In a recent study of our team comparing COVID-19 patients versus controls, with an enrichment of acute phase proteins and a depletion of apolipoproteins, HDL particles proteome was profoundly altered in COVID-19 patients (20). Moreover, in our *in vitro* analyses, we underlined that HDL from COVID-19 patients was much less endothelioprotective (20).

Whereas previous studies mostly compared COVID-19 patients with controls, the aim of the present work was to compare apolipoprotein concentrations of deceased patients with those of patients who survived an episode of COVID-19 leading to severe form of the disease. The second objective of this work was to characterize HDL particles (size and proteome) at admission to ICU between deceased patients and survivors.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study population**

We conducted an analysis with data from the prospective French COVID cohort (NCT04262921) (21). The French COVID cohort includes hospitalized patients with a PCR-confirmed COVID-19 and who gave written consent. The study was sponsored by INSERM, conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and Ethics approval was given by the French Ethics Committee CPP Ile-de-France VI (ID RCB: 2020-A00256-33). We selected adult patients from the French COVID cohort study, from February 1, 2020 until July 31, 2020 (corresponding to the first wave of pandemic in France). Pregnant women were excluded. None of the patients received corticosteroids. In this study, patients selected from the French COVID cohort had to meet the following criteria: - admitted in ICU; - at least 1 ml of plasmas for lipoprotein isolations and analyze; - not be on long-term statin therapy.

### **2.2. Quantification of lipoprotein subpopulation by tube gel electrophoresis (Quantimetrix Lipoprint)**

Plasma HDL subpopulations were determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using Quantimetrix Lipoprint HDL (Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA). Lipoprint was performed and analyzed according to the manufacturer's protocol. Briefly, 25  $\mu$ L EDTA plasma was mixed with 300  $\mu$ L loading gel, and this sample gel was applied to the Lipoprint HDL gel tube before photopolymerization for 35 minutes at RT. Gel tube electrophoresis was performed at 3 mA/gel tube until albumin reached 1.5 cm at the end of the gel tube ( $\pm$  50 min). After resting in the dark for 30 min, the tubes were scanned and analyzed using Lipoware HDL software. After tube analysis, three main subpopulations were determined from the 10 subpopulations measured: large HDL (HDL-1 to HDL-3), intermediate HDL (HDL-4 to HDL-7) and large HDL (HDL-8 and HDL-10).

### **2.3. Lipoprotein isolation from plasma**

All subsequent steps were performed under a Class II microbial safety bench. Lipoproteins were isolated from EDTA plasma by three-step ultracentrifugation. All ultracentrifugation steps were performed at 252,000 g for 20 hours at 10°C using ultracentrifuge tubes placed in a 50.4 Ti rotor in a Beckman Coulter Optima L-80 XP ultracentrifuge. For the first ultracentrifugation step, plasma was weighed to a density of 1.019 using a potassium bromide (KBr) solution with a density of 1.35. The weighted plasma was covered with a 1.019 density KBr solution in ultracentrifugation tubes. After ultracentrifugation, the upper fraction corresponding to VLDL was collected. For the second ultracentrifugation step, plasma was collected and weighted to a density of 1.063 using a KBr solution with a density of 1.35. The weighted plasma was covered with a 1.063 density KBr solution in ultracentrifuge tubes. After ultracentrifugation, the upper fraction corresponding to LDL was collected. For the final ultracentrifugation step, plasma was weighed to a density of 1.21 using a KBr solution with a density of 1.21. The weighted plasma was covered with a 1.21 density KBr solution in ultracentrifugation tubes. After ultracentrifugation, the upper fraction corresponding to HDL was collected. After isolation, lipoproteins were washed five times with saline EN buffer (0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.025% NaN<sub>3</sub>, pH 7.3) using a centrifugal filtration tube (Amicon Ultra, 3 kDa cut-off, UFC500396). Tubes were

centrifuged at 14,000g for 15 minutes at 4°C, and the volume was concentrated to 100 µL. Lipoprotein proteins were then assayed by the bicinchoninic acid method (BCA, Sigma), and HDL purity was verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with Coomassie blue staining.

#### **2.4. Fast protein Liquid Chromatography (FPLC)**

HDL isolated from each patient was purified in an ÄKTA Pure FPLC system (GE Healthcare) on a Superdex™ 200 Increase 10/300 GL column (10 x 300 mm; Cytiva) in EN saline buffer. HDL was loaded into a 500 µL loop and injected at a flow rate of 0.250 mL/min. Elution was then performed with Saline EN buffer at a constant flow rate of 0.300 mL/min, and fractions were collected every 500 µL. Finally, the column was washed with two column volumes at a flow rate of 0.700 mL/min.

#### **2.5. Label-free Quantification by Nano LC-MS/MS analysis**

Label-free protein quantification was performed on HDL at the time of ICU admission from patients who survived their COVID-19 (n=14) and on HDL from patients who did not survive their severe COVID-19 (n=15).

##### **2.5.1. HDL sample preparation and proteolytic digestion**

The concentration of total HDL protein was measured using the BCA assay, with bovine serum albumin serving as the standard. As previously described (22), 5 µg HDL was combined with 25 µL digestion buffer (6 M urea, 50 mM ammonium bicarbonate) and denatured at 80°C for 10 minutes for sample preparation. Dithiothreitol was used for sample reduction, followed by iodoacetamide alkylation. Upon alkylation, the samples were diluted with four volumes of 50 mM ammonium bicarbonate to reduce the urea concentration. The HDLs were digested with 3 µg of dityrosylphenylalanyl chloromethyl ketone trypsin (TPCK-treated Sigma) overnight at 37°C. Tryptic digestion was halted with 2% TFA and incubated at 4°C for 15 minutes. Subsequently, samples were centrifuged at 14,000 g for 15 minutes at 10°C and the desalted peptides in the supernatant were collected on peptide desalting spin columns (Thermo Fisher Scientific Pierce, part number 2162704). Peptides were eluted using a solution of 50% acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), followed by drying with a Speed Vacuum. Then, 20 µL of 40% ACN with 0.1% TFA was used to elute the peptide, which was subsequently vacuum-dried at 60°C prior to mass spectrometric analysis.

##### **2.5.2. Nano LC-MS/MS method**

The method was carried out with two solvents, solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN). Digested peptides were solubilized in 20 µL of 4% ACN with 0.1% TFA. Mass spectrometry analysis was performed by nano-LC on a Thermo Fisher Ultimate 3000 Series NCS-3500 RS coupled to a nanospray ionization (NSI)-Q-Orbitrap mass spectrometer (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) (20). Briefly, 5 µL of samples were injected into a C18 LC-EASY-spray column (2 µm, 100 Å, 75 µm x 50 cm, Thermo Fisher Scientific). Peptides were eluted on two linear elution gradients starting from 4% to 25% solution B (0.1% formic acid in 80% ACN) until 103 min, and then from 25% to 40% solution for 20 min. The column was then washed for 5 min with 90% solution B and equilibrated with 4% solution B for 20 min. Solution A was composed of 0.1% formic acid in water. To minimize contamination

between samples, two blank runs containing solution A were conducted after every sample run. The flow rate was maintained at 0.300  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and the column temperature was maintained at 40°C. The NSI was set at 1.8 kV, the capillary temperature was set at 275°C, and the S lens RF level was set at 30% for mass spectrometry parameters.

The mass spectra were obtained in positive ion mode using data-dependent acquisition within the  $m/z$  range of 350 to 2,000. Full scan mass spectra were acquired at a resolving power of 70,000 (at  $m/z$  400) using automatic gain control (AGC) at a set value of  $5e5$  and a maximum injection time (Max IT) of 100 ms. MS/MS spectra of the top ten most intense precursor ions were acquired at a resolving power of 35,000 (at  $m/z$  400) with an AGC set to  $1e5$  and a maximum IT of 100 ms. Peptide fragmentation was performed by setting the normalized collision energy to 28. Precursor ions were excluded dynamically for 60 seconds to prevent peptide selection repetition. The Orbitrap's performance was assessed weekly, and the mass spectrometer underwent external calibration before analysis using the LTQ ESI positive ion calibration solution (Pierce™). XCalibur 4.2.47 software (Thermo Fisher Scientific) was used to collect the data.

### 2.5.3. Protein identification and quantification

Protein identification and quantification were performed automatically from the raw files with Proteome discoverer software (version 2.2.2.0). MS and MS/MS spectra were compared to the Uniprot Human reference proteome database containing only canonical sequences (26 559 sequences; 01 July 2021) using the SEQUEST HT search engine. The following features were defined in SEQUEST HT for identification: variable modifications are methionine oxidation and N-terminal acetylation of proteins, then, a fixed modification sets the carbamidomethylation of proteins and the specific enzyme selected is trypsin with two miscleavage allowed. A mass tolerance of 10 ppm for precursor ions and 0.02 Da for-product ions was used in SEQUEST HT. A decoy database search strategy with target inversion was applied with a false discovery rate (FDR) set at 1% for proteins and peptides. Then, only proteins with at least one unique peptide with a Sequest Score ( $X_{\text{corr}} \geq 1.5$ ) were used and for  $X_{\text{corr}} < 1.5$ , manual verification of peptide identification was performed on the MS/MS spectrum. Identified peptides were quantified by label-free using the peak intensity of a validated peptide (unique and razor) for a given protein. After quantification, all proteins with more than 60% missing value were not considered in the analysis. For proteins with  $\leq 60\%$  missing values, they were replaced by the IQR of the corresponding proteins in the respective groups. The list of identified and quantified proteins and peptides is available in the supplemental table.

### 2.5.4. Data processing

Proteome Discoverer (version 2.2.2.0) was utilized for the computations. Protein abundance refers to the mean of the protein intensities observed in all samples among each group (COVID-19 survivors versus non-survivors). Protein intensity was defined as the combination of protein and peptide intensities measured for each individual. All protein intensity values were subjected to logarithmic transformation (base 2). The  $\log_2$  (Fold Change) is determined by taking the base 2 logarithm of the disparity between the average intensities

of a specific protein in COVID-19 patients who did not survive and the average intensities of the same protein in COVID-19 patients who did survive.

## 2.6. Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the data distributions. Mann-Whitney test or unpaired t-test was then performed, as appropriate, to compare patients who survived COVID-19 with those who did not. A volcano plot was generated by Prism to evaluate differential proteins on the basis of two indicators: the  $-\log_{10}$  p-value of the Mann-Whitney test and the  $\log_2$  (protein abundance fold change of non-survivors and survivors). Marker performance was measured using receiver operating characteristic (ROC) curves. A *p-value* <0.05 is considered to indicate a statistically significant result. Statistical analyses were performed using Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1 Study population

37 patients were included in this analysis. Survivors (n=18) and non-survivors (n=19) were matched based on age and gender. General characteristics of the patient population are presented in **Table 1** and a flow chart is expressed on supplemental figure S1.

**Table 1. Characteristics and outcomes of the study population**

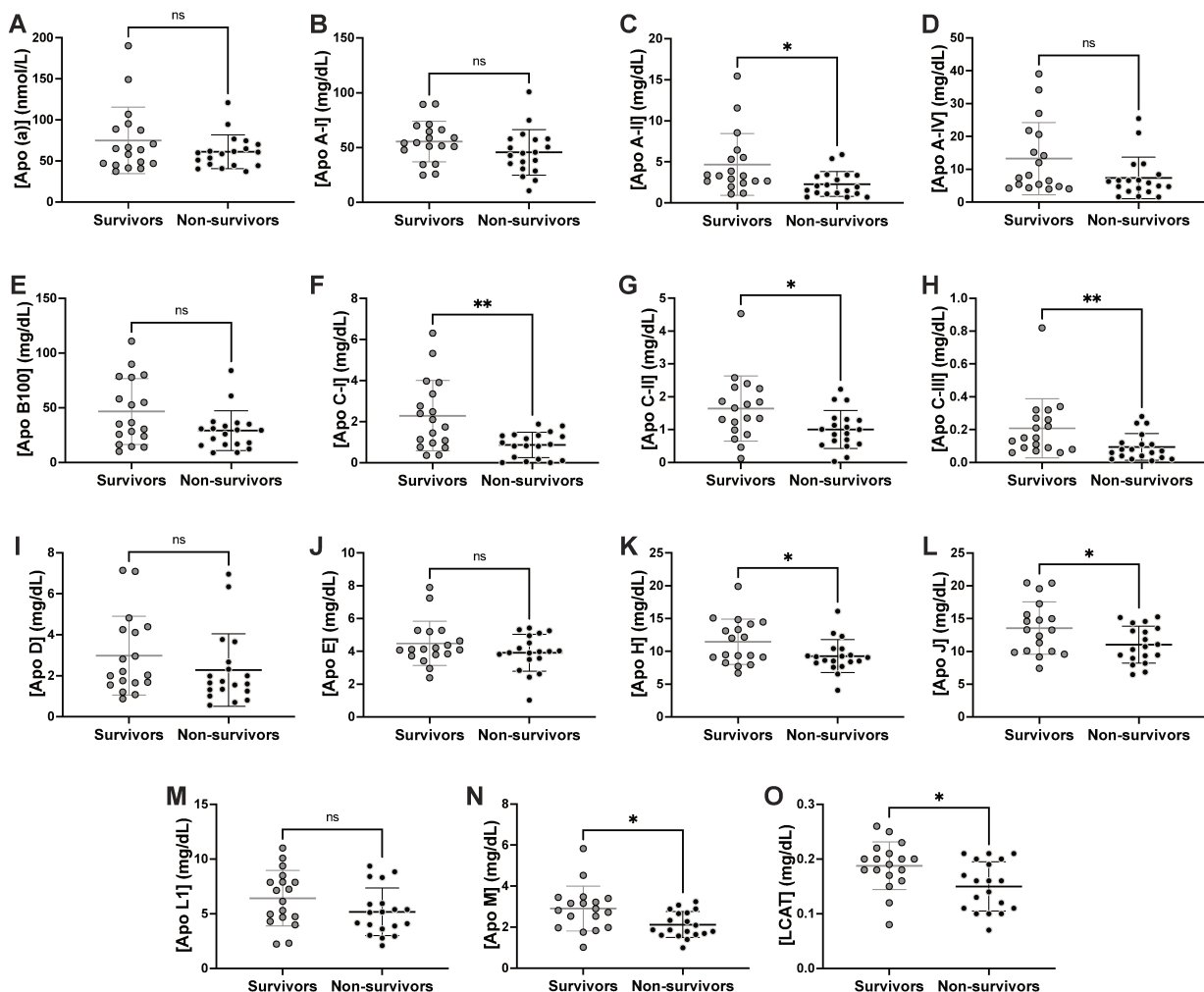
Characteristics	Study population (n=37)	Survivors (INC) (n=18)	Non-survivors (n=19)	Survivors (INC) vs Non-survivors <i>p-values</i>
Age, years, median [IQR]	61 [54; 68]	59 [51; 65]	61 [57; 68]	0.3047 (ns)
Male sex, n (%)	37 (89%)	16 (89%)	17 (89%)	>0.9999 (ns)
Obesity	13 (35%)	6 (33%)	7 (37%)	>0.9999 (ns)
BMI, kg/m <sup>2</sup> , median [IQR]	28 [24; 31]	26 [24; 30]	29 [25; 33]	0.3677 (ns)
High Blood pressure, n (%)	15 (41%)	5 (28%)	10 (53%)	0.1837 (ns)
Diabetes mellitus, n (%)	13 (35%)	5 (28%)	8 (42%)	0.4951 (ns)
Timing between fist symptoms and hospitalization (days), median [IQR]	8 [5; 9]	8 [5; 11]	7 [5; 9]	0.6781 (ns)
<b>Medication</b>				
Statin, n (%)	0	0	0	>0.9999 (ns)
Corticosteroides, n (%)	0	0	0	>0.9999 (ns)
<b>Outcomes</b>				
Time between admission to ICU and death (days), median [IQR]	13 [8; 27]	N.A.	13 [8; 27]	N.A.
<b>Clinical features</b>				
TC, mmol/L, median [IQR]	3.45 [3.09; 3.91]	3.28 [2.81; 3.62]	3.62 [3.19; 4.24]	0.0426 (*)
HDL-C, mmol/L, median [IQR]	0.49 [0.40; 0.58]	0.50 [0.43; 0.58]	0.48 [0.40; 0.63]	0.8381 (ns)
LDL-C, mmol/L, median [IQR]	1.64 [1.37; 2.15]	1.98 [1.51; 2.26]	1.46 [1.34; 2.06]	0.1100 (ns)
TG, mmol/L, median [IQR]	1.74 [1.51; 2.06]	1.71 [1.52; 2.17]	1,75 [1.46; 1.95]	0.0554 (ns)

*BMI: body mass index; TC: total cholesterol; HDL-C: high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein-cholesterol; TG: triglycerides*



### 3.2 Comparison of plasma apolipoprotein concentrations between COVID-19 survivors and non-survivors

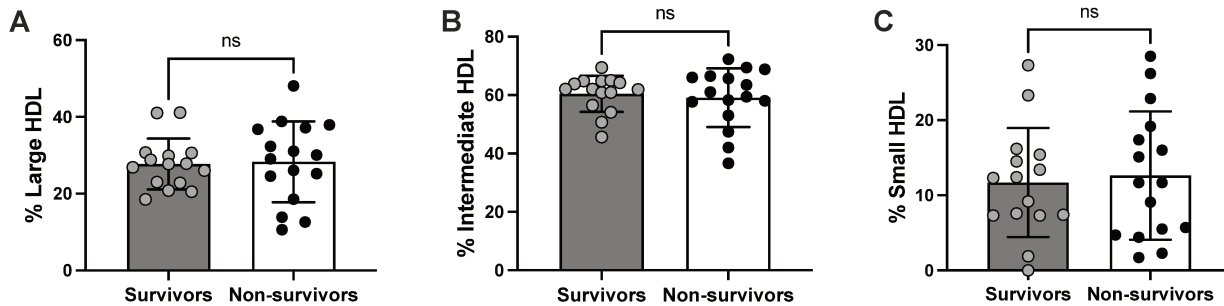
We used mass spectrometry to measure 14 apolipoproteins and LCAT directly from the plasma of COVID-19 survivors and non-survivors. The following apolipoproteins were measured: Apo(a), Apo As (A-I, A-II, A-IV), Apo B100, Apo Cs (C-I, C-II, C-III), Apo D, Apo E, Apo H, Apo J, Apo L1, and Apo M. The concentration of seven apolipoproteins was significantly reduced in patients who did not survive compared with those who did. These apolipoproteins include Apo A-II ( $4.68 \pm 3.76$  vs.  $2.30 \pm 1.51$ ;  $p = 0.0147$ ), Apo Cs (C-I ( $2.29 \pm 1.71$  vs.  $0.87 \pm 0.62$ ;  $p = 0.0060$ ), C-II ( $1.64 \pm 0.99$  vs.  $1.00 \pm 0.58$ ;  $p = 0.0269$ ) and C-III ( $0.21 \pm 0.18$  vs.  $0.09 \pm 0.08$ ;  $p = 0.0045$ ), Apo H ( $11.45 \pm 3.45$  vs.  $9.28 \pm 2.52$ ;  $p = 0.0351$ ), Apo J ( $13.55 \pm 3.99$  vs.  $11.03 \pm 2.81$ ;  $p = 0.0318$ ) and Apo M ( $2.90 \pm 1.09$  vs.  $2.12 \pm 0.63$ ;  $p = 0.0112$ ). Furthermore, the concentration of LCAT ( $p = 0.0137$ ) is also significantly diminished in patients who did not survive COVID-19. Results are expressed in **Figure 1**.



**Figure 1. Apolipoprotein changes in COVID-19 non-survivors in ICU.** A panel of 14 apolipoproteins and LCAT (A-O) was quantified by mass spectrometry in the plasma of 18 surviving and 19 non-surviving COVID-19 patients. A Shapiro-Wilk normality test was performed to determine whether to use an unpaired t-test for parametric data or a Mann-Whitney test for nonparametric data. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , ns  $p \geq 0.05$  comparing survivors and non-survivors of COVID-19.

### 3.3 Modulation of HDL subpopulations size between survivors and non-survivors COVID-19 patients

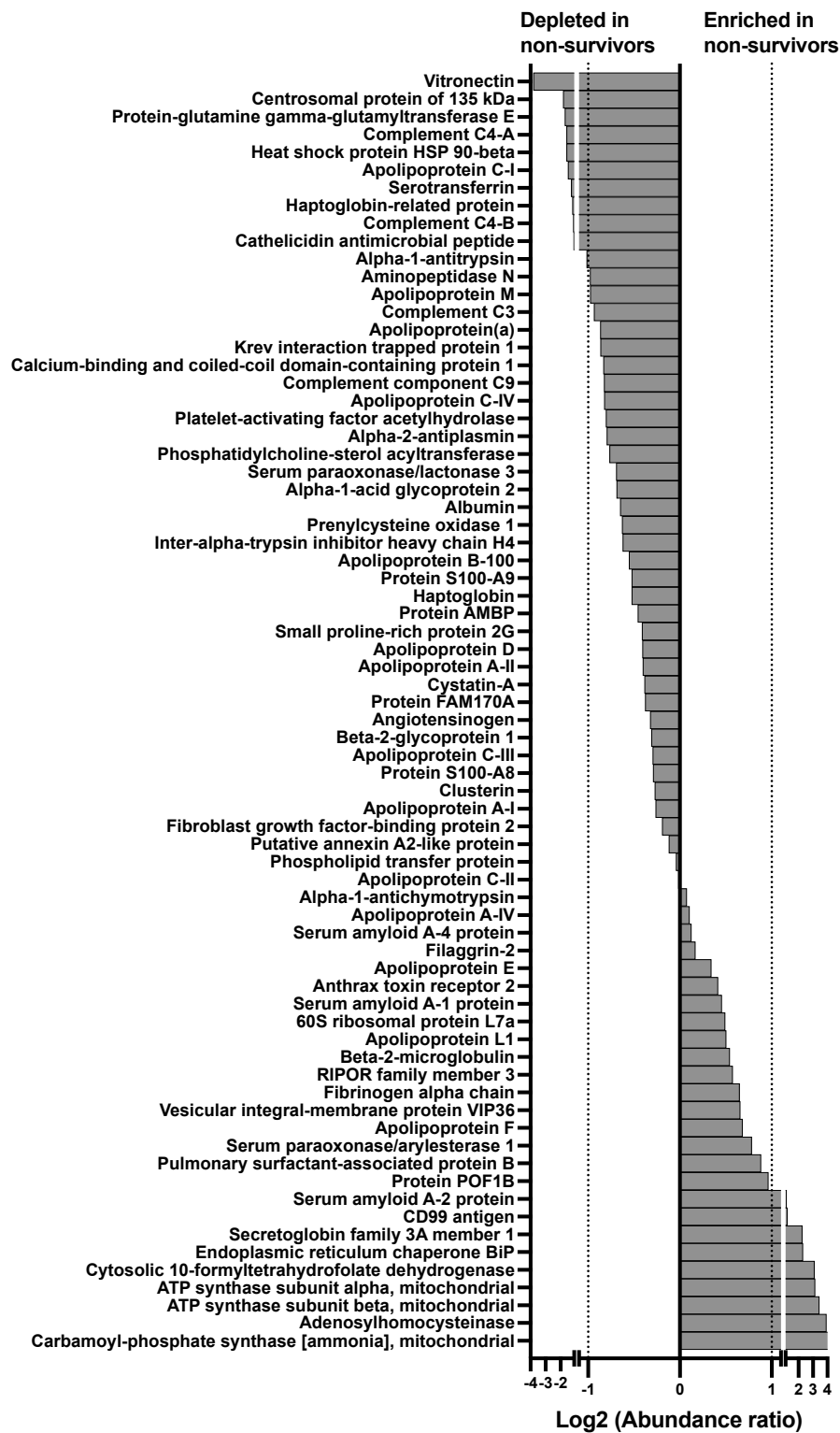
The different HDL subpopulations size (large – intermediate – small) of COVID-19 patients were determined using the Lipoprint HDL tube gel electrophoresis technique. No difference was found between groups (Figure 2).



**Figure 2. HDL subpopulations remain unchanged in survivors and non-survivors.** The distribution of HDL subpopulations (Large (A), Intermediate (B) and Small (C)) in 15 survivors (gray dots) and 16 non-survivors (black dots) were found to be identical. A Shapiro-Wilk test was conducted to verify the normal distribution of small, intermediate and large HDL, followed by an unpaired t-test for Large HDL and a Mann Whitney test for Intermediate and Small HDL. Each point indicates the percentage of cholesterol per patient. No significant differences were observed in comparisons between survivor and non-survivor groups ( $p \geq 0.05$ ).

### 3.4 HDL proteome analysis of surviving versus non-surviving patients of their COVID-19

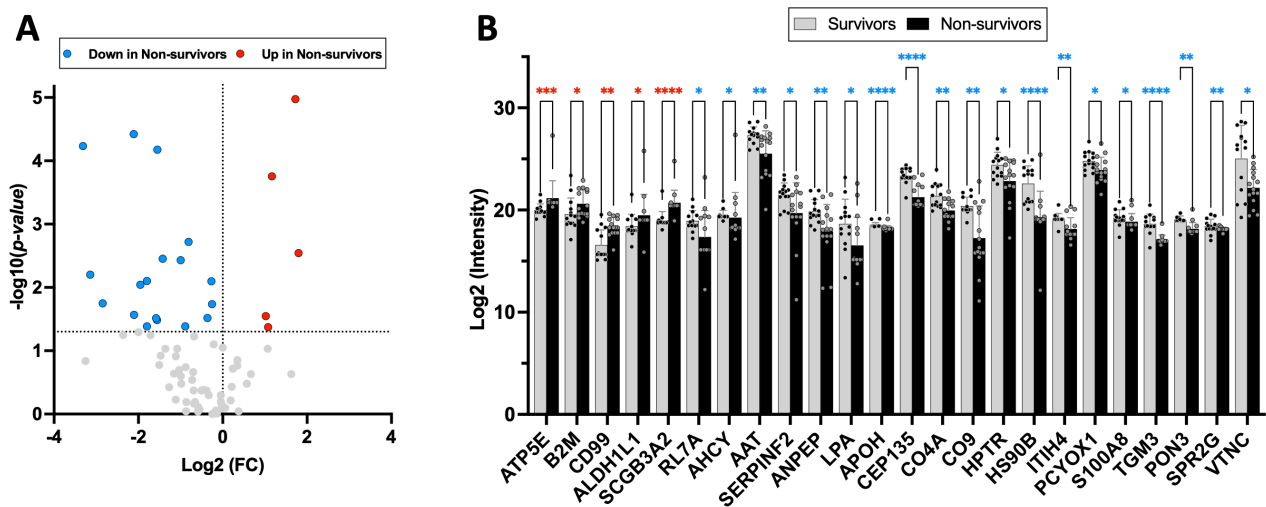
HDL was isolated and prepared for shotgun proteomics analysis from 14 COVID-19 survivor patients and 15 non-survivor COVID-19 patients. Digested peptides obtained from 5  $\mu$ g of HDL were prepared and analyzed using mass spectrometry combined with NanoLC. A first analysis of the MS/MS spectra by Proteome Discoverer software from the SEQUEST HT database identified 97 proteins that may be associated with HDL from either surviving or non-surviving patients (see Supplemental Table S2). After verification, our inclusion criteria (see Materials and Methods) indicate that 72 proteins are actually associated with patient HDL. To compare COVID-19 survivor and non-survivor groups, we conducted a fold change analysis of intensities associated with HDL proteins prior to log base-2 transformation. Out of the 72 proteins identified, the relative abundance of 11 proteins was lower in non-survivor HDL as compared to control HDL. These proteins included alpha-1 antitrypsin (AAT), cathelicidin antimicrobial peptide, complement C4 (A, B), serotransferrin, apolipoprotein C-I, heat shock protein HSP90-beta, protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E, centrosomal protein, and vitronectin. In contrast, HDL from non-survivors showed an increased abundance of nine proteins, including serum amyloid A-2, CD99 antigen, mitochondria-associated proteins, and cellular debris (Figure 2).



**Figure 3. Relative abundance of proteins identified in HDL isolated from plasma of COVID-19 surviving (n=14) and non-surviving (n=15) patients.**

The intensities of the 72 proteins associated with HDL in the patients were logarithmically transformed to base 2 to facilitate statistical analyses. The results indicate that HDL protein profile displays more significant alterations in non-surviving COVID-19 patients when compared to those who survived. Specifically, there were significant differences in the levels of 24 proteins in the HDL of non-survivors relative to COVID-19 survivors (**Figure 4.A**). The levels of 19 of these proteins were significantly lower in the HDL of the non-

survivors. The mentioned proteins comprise ribosomal protein 60S L7a (RL7A), adenosylhomocysteinase (ALDH1L1), alpha-1-antitrypsin (AAT), alpha-2-antiplasmin (SERPINF2), aminopeptidase N (ANPEP), apolipoprotein (a) (LPA), apolipoprotein H (APOH), 135 kDa centrosomal protein (CEP135), complement C4-A (CO4A), complement component C9 (CO9), haptoglobin-related protein (HPTR), heat shock protein HSP 90-beta (HS90B), prenylcysteine oxidase 1 (PCYOX1), protein S100-A8, protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E, paraoxonase serum/lactonase 3 (PON3) and vitronectin (VTNC). However, five proteins are significantly elevated in HDL from the non-surviving group. The proteins that have increased are ATP synthase subunit beta mitochondrial (ATP5E), beta-2-microglobulin (B2M), CD99 antigen (CD99), cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (ALDH1L1) and secretoglobin family member 1 3A (SCGB3A2) (Figure 4.B).

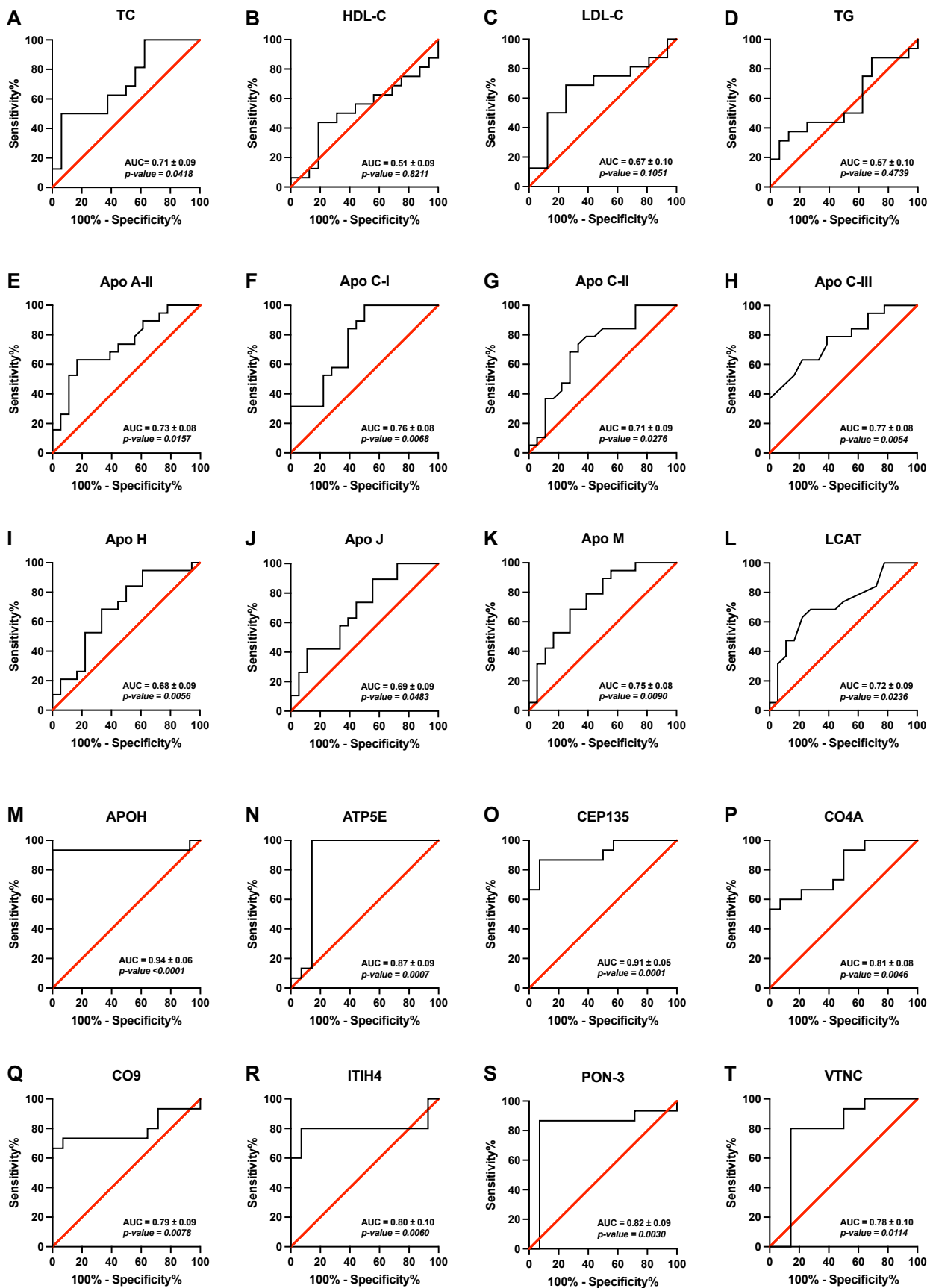


**Figure 4. Altered HDL proteome in COVID-19 patient non-survivors. (A)** Volcano plot showing proteins differentially expressed in HDL from survivors (n=14) and non-survivors (n=15). Red points represent proteins with higher levels in non-survivor HDL, while blue points represent proteins with lower levels in non-survivor HDL. The y-axis represents  $-\log_{10}(\text{Mann-Whitney } p\text{-value})$  and the x-axis represents  $\log_2(\text{P.A.I fold change of non-survivors and survivors})$ . **(B)** Protein abundance of HDL isolated from the plasma of the 14 survivors and 15 non-survivors of COVID-19. Mann-Whitney test was used to compare HDL protein abundance in survivors and non-survivors. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### **3.5 Diagnostic performance via receiver characteristic (ROC) curve**

ROC curves were used to assess the diagnostic accuracy of diverse lipid markers (Figure 5). Except for TC (AUC=0.71  $\pm$  0.09,  $p=0.0418$ ), the regular lipid markers had areas under the curve (AUC) lower than 0.7 and a  $p$ -value over 0.05 (Figure 5 A-D). Plasma apolipoproteins and LCAT provide a AUC score of greater than 0.7 for all except Apo H (AUC = 0.68  $\pm$  0.09,  $p= 0.0056$ ) and Apo J (AUC = 0.69  $\pm$  0.09,  $p= 0.0483$ ), which are unreliable indicators of patient outcomes (Figure 5 E-L). Among the potential markers identified in HDL particles from COVID-19 patients are Apo H (AUC = 0.94  $\pm$  0.06,  $p < 0.0001$ ) and the 135 kDa CEP135 protein (AUC = 0.91  $\pm$  0.05,  $p = 0.0001$ ), all of which have shown significant effectiveness in predicting survival, with an AUC greater than 0.90. When using patient HDL proteins as markers, ATP5E, CO4A, PON3 and ITIH4

demonstrate effectiveness in predicting patient survival, while CO9 display lesser effectiveness with a lower AUC (Figure 5 M-T).



**Figure 5: Receiver Operating Characteristic (ROC) curve.** ROC curve of the routine lipid markers (A-D). ROC curve of plasma apolipoproteins varying significantly between COVID-19 survivor vs. non-survivor groups (E-L). ROC curve of altered proteins in the HDL proteome of patients surviving vs. not surviving their COVID-19 (M-T). The red line corresponds to random classifier.

#### 4. Discussion

In this present study, we have therefore shown that while lipid profiles on admission to ICU for COVID-19 cannot be used to stratify patients who died from those who survived, plasma analysis of certain apolipoproteins and proteomic analysis of HDL seem to be able to do so. Especially, APOH and CEP135 are potentially novel biomarkers for COVID-19 severity linked to HDL proteins.

Lipid metabolism plays a key role in SARS-CoV-2 infection. Several hypotheses have been proposed to explain the changes in lipid metabolism, including viral use and modification of lipids to support replication, hemodilution, and increased vascular permeability. (23, 24). Lowering cholesterol levels in lipoproteins is also aided by the cytokine storm (25). However, while in bacterial sepsis HDL-C concentrations are associated with patient outcome and in particular mortality, these links were not found in COVID-19 (13, 14, 20, 26–30). In this present study, we confirmed that HDL-C, LDL-C, and TG concentrations are similar between survivors and non-survivors COVID-19 patients. Similarly, Sun et al. reported no disparity in HDL-C, LDL-C, and TC levels between surviving and non-surviving patients with COVID-19, although TG levels were higher in non-surviving patients.

We have also shown that a crude concentration of HDL-C does not appear to be sufficient to stratify patients during COVID-19. Thus, the first step was to characterize the plasma apolipoproteins which are key regulators of lipid metabolism and have anti-inflammatory, antioxidant and endothelial protective properties (9, 31). The mechanisms between apolipoproteins and the severity of COVID-19 are not yet fully understood. However, multiple studies have demonstrated a negative correlation between Apo A-I and Apo B levels and the severity of COVID-19 (16, 32, 33). In our previous studies, we demonstrated that COVID-19 patients exhibit diminished levels of nine Apo forms, such as Apo A-II, C (I, II), H, J, M, as well as LCAT, alongside elevated levels of Apo E as compared to controls (13). Our study confirms the previous one and highlights several apolipoproteins that are significantly more reduced on admission to ICU in patients who will die secondarily, such as Apo A-II, Apo Cs (C-I, C-II and C-III), Apo H, Apo J and Apo M. Most of these apolipoproteins are linked to reduced macrophage function (34). Cholesterol efflux by macrophages induces production of Apo C through Liver X Receptor (LXR) activation (35). Reduced Apo C concentrations indicate a decrease in macrophage cholesterol efflux function.

Interestingly, we observed a decreased in Apo A-II but not in Apo A-I concentrations among non-survivors of COVID-19 when compared to survivors. This observation differs from most of the studies reporting essentially a decrease in Apo A-I concentration with an association with worse outcome (32, 33). This difference can be attributed to the sample size, which is significantly larger than ours. Moreover, corticosteroid therapy modifies lipid profile. Our findings show a trend towards reduced Apo A-II concentrations. Our previous studies, however, observed apo A-II concentrations in both HDL and plasma of COVID-19 patients (13, 20). Additionally, other research has also seen lower Apo A-II levels in COVID-19 patients (34, 36). This decrease in Apo A-II suggests a potential alteration in cholesterol efflux, as well as a decrease in the anti-inflammatory and antioxidant properties of HDL (37, 38).

It is interesting to note that ApoB100 and LCAT were associated with mortality in our last study (13) but not in this work. The role of Apo H, also known as beta-2-glycoprotein 1, is not well understood. According to earlier research (39), it has been observed that Apo H levels decrease in COVID-19 patients. This decrease in Apo H could potentially create a prothrombotic environment in COVID-19, leading to antiphospholipid syndrome. This decrease in Apo H could potentially create a prothrombotic environment in COVID-19, due to an antiphospholipid syndrome. Furthermore, Apo H seems to capture the SARS-CoV-2 virus, leading to the hypothesis that the virus utilizes Apo H (40). Clusterin, also known as Apo J, acts as an inhibitor of the complement system (41). Reductions in the concentration of Apo J led to complement system activation, which then causes a prothrombotic environment (42, 43). Our study indicates also that Apo M levels were decreased in COVID-19 patients who did not survive. A study conducted by Marfia et al (44) showed that the concentration of sphingosine-1-P (S1P) was closely related to the concentration of apo M and was able to accurately predict the prognosis of COVID-19 patients. Our findings reaffirm that Apo M can serve as a potential marker for assessing COVID-19 severity. Furthermore, Apo M depletion is associated with loss of anti-inflammatory and anti-atherogenic functions of S1P/ApoM complex (45, 46). Therefore, deficiency of these apolipoproteins promotes an overall thromboinflammatory environment (47).

Our study revealed a decrease in 19 proteins and an increase in five proteins in the HDL of non-surviving COVID-19 patients. Among the proteins increased in the HDL of COVID-19 patients, the CD99 antigen plays a key role in the T-cell adhesion process. CD99 is mainly localized on T lymphocytes and endothelial cells. The level of this particular protein is lower in COVID-19 patients with severe symptoms, indicating reduced endothelial integrity and recruitment of monocytes, neutrophils and T cells (48). A hypothesis to explain its increase in HDL from non-survivors of COVID-19 is that it is captured by the latter. HDL levels in non-survivors are found to be enriched with mitochondrial ATP synthase subunit beta, which interacts with the ecto-F1-ATPase receptor on the cell surface (49). SARS-CoV-2 is able to interact with ecto-F1-ATPase and ATP synthase (50, 51). An elevated beta-2-microglobulin has been identified as a potential biomarker of COVID-19 severity (52, 53), which may explain the elevated levels in the HDL of non-surviving COVID-19 patients. Interestingly,

the HDL proteins of non-survivors of COVID-19 exhibit a decrease in AAT, I'TIH4, Complement C4A, and C9, which are normally increased in plasma as COVID-19 severity increases. This increase could be explained by an increase in the compounds and proteins of the acute phase complement and a decrease in the proteins involved in the coagulation cascade (54, 55). Among the coagulation-related proteins, the levels of beta 2 glycoprotein 1 (Apo H) are reduced in the HDL of COVID-19 non-survivors, suggesting a disturbance in the coagulation cascades (34, 55). The remodeling of high-density lipoprotein in patients during the COVID-19 pandemic suggests a loss of high-density lipoprotein (HDL) functionality (20).

Our study is the first to investigate LDL and HDL distribution changes during COVID-19 using tube gel electrophoresis (Lipoprint) among patients who survived or did not survive the disease. The distribution of lipoproteins was similar regardless of patient outcome. COVID-19 brings about a modification in the lipoprotein subpopulations' distribution. This change is characterized by a reduction in the concentrations of small, intermediate, and large subpopulations of HDL and large LDL, accompanied by an escalation in small and dense LDL concentrations. (56).

Finally, routine lipid markers in our study demonstrated poor accuracy in assessing disease severity. It is surprising to observe this in light of the association between HDL-C and disease severity (57). In contrast, apolipoproteins have superior performance to routine lipid assays in assessing patient outcome. This is expected since various studies have shown that apolipoproteins are decreased in COVID-19 (13, 23, 32–34). However, it seems that HDL-associated Apo H is a more accurate indicator of COVID-19 severity than total plasma Apo H. Nevertheless, these results merit further analysis with more patients included.

The primary obstacle we encountered was the small number of available samples, which hindered our ability to conduct experiments on a representative sample of the population under study. Nevertheless, our preliminary results are promising. This study is focused on a modest sample of 37 patients during the initial wave of COVID-19, providing supplementary information to the current knowledge on COVID-19. Another limitation is the low levels of HDL volume of patients included in our study. It would be pertinent to evaluate the lipoproteins' functionality to ascertain the effect of changes in their proteome. Further comparative studies carried out in various centers can help confirm and validate the conclusions presented in our research.

In conclusion, in a cohort of patients hospitalized in ICU for severe COVID-19, we demonstrated major differences in plasma apolipoproteins and in protein composition of HDL by comparing surviving and non-surviving patients. These markers, measured on admission to ICU, also appear to be more predictive of mortality than BASIC lipid concentrations such as HDL-C. Nevertheless, these results should be interpreted



with caution given the small number of patients included in this study. In this context, it is important to conduct a high-powered multicenter study in the future.

## 5. Acknowledgments

FB is financed by a grant from the Région Réunion for their PhD (European Union-Reunion Region).

## 6. Authors contributions

OM, DC and ST designed the study. FB, BV acquired the data. FB, OM, ST analyzed the data. FB, ST, OM wrote the manuscript. PR, OM, ST critically reviewed the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

## 7. Conflicts of interests

The authors declare that they have no conflict of interest to disclose.

## 8. References

1. Li, Q., X. Guan, P. Wu, X. Wang, L. Zhou, Y. Tong, R. Ren, K. S. M. Leung, E. H. Y. Lau, J. Y. Wong, X. Xing, N. Xiang, Y. Wu, C. Li, Q. Chen, D. Li, T. Liu, J. Zhao, M. Liu, W. Tu, C. Chen, L. Jin, R. Yang, Q. Wang, S. Zhou, R. Wang, H. Liu, Y. Luo, Y. Liu, G. Shao, H. Li, Z. Tao, Y. Yang, Z. Deng, B. Liu, Z. Ma, Y. Zhang, G. Shi, T. T. Y. Lam, J. T. Wu, G. F. Gao, B. J. Cowling, B. Yang, G. M. Leung, and Z. Feng. 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine*. **382**: 1199–1207.
2. Zhu, N., D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G. F. Gao, and W. Tan. 2020. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. **382**: 727–733.
3. Zhang, X., Y. Tan, Y. Ling, G. Lu, F. Liu, Z. Yi, X. Jia, M. Wu, B. Shi, S. Xu, J. Chen, W. Wang, B. Chen, L. Jiang, S. Yu, J. Lu, J. Wang, M. Xu, Z. Yuan, Q. Zhang, X. Zhang, G. Zhao, S. Wang, S. Chen, and H. Lu. 2020. Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature*. **583**: 437–440.
4. WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 infection. 2020. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis*. **20**: e192–e197.
5. Vaninov, N. 2020. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat Rev Immunol*. **20**: 277–277.
6. Hu, B., S. Huang, and L. Yin. 2021. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*. **93**: 250–256.
7. Yang, Y., C. Shen, J. Li, J. Yuan, M. Yang, F. Wang, G. Li, Y. Li, L. Xing, L. Peng, J. Wei, M. Cao, H. Zheng, W. Wu, R. Zou, D. Li, Z. Xu, H. Wang, M. Zhang, Z. Zhang, L. Liu, and Y. Liu. 2020. Exuberant elevation of IP-10, MCP-3 and IL-1ra during SARS-CoV-2 infection is associated with disease severity and fatal outcom. [online] <https://europepmc.org/article/PPR/PPR115968> (Accessed September 14, 2023).

8. Jonas, A., and M. C. Phillips. 2008. *In Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. pp. 485–506. , Elsevier. [online] <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444532190500192> (Accessed August 4, 2023).
9. Dominiczak, M. H., and M. J. Caslake. 2011. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*. **48**: 498–515.
10. Alaupovic, P. 1996. *In Methods in Enzymology Plasma Lipoproteins Part C: Quantitation*. pp. 32–60. , Academic Press. [online] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687996630043> (Accessed July 21, 2022).
11. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. 2020. *Journal of Clinical Lipidology*. **14**: 297–304.
12. Almas, T., J. Malik, A. K. Alsubai, M. Ehtesham, T. Laique, U. Ishaq, A. Mehmood, S. M. Jawad Zaidi, S. Hadeed, H. Huang, and M. Oruk. 2022. Effect of COVID-19 on lipid profile parameters and its correlation with acute phase reactants: A single-center retrospective analysis. *Annals of Medicine and Surgery*. **78**: 103856.
13. Begue, F., K. Chemello, B. Veeren, B. Lortat-Jacob, A. Tran-Dinh, N. Zappella, A. Snauwaert, T. Robert, P. Rondeau, M. Lagrange-Xelot, P. Montravers, D. Couret, S. Tanaka, and O. Meilhac. 2023. Plasma Apolipoprotein Concentrations Are Highly Altered in Severe Intensive Care Unit COVID-19 Patients: Preliminary Results from the LIPICOR Cohort Study. *International Journal of Molecular Sciences*. **24**: 4605.
14. Tanaka, S., C. D. Tymowski, M. Assadi, N. Zappella, S. Jean-Baptiste, T. Robert, K. Peoc'h, B. Lortat-Jacob, L. Fontaine, D. Bouzid, A. Tran-Dinh, P. Tashk, O. Meilhac, and P. Montravers. 2020. Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLOS ONE*. **15**: e0239573.
15. Li, Y., Y. Zhang, R. Lu, M. Dai, M. Shen, J. Zhang, Y. Cui, B. Liu, F. Lin, L. Chen, D. Han, Y. Fan, Y. Zeng, W. Li, S. Li, X. Chen, H. Li, and P. Pan. 2021. Lipid metabolism changes in patients with severe COVID-19. *Clinica Chimica Acta*. **517**: 66–73.
16. Ulloque-Badaracco, J. R., E. A. Hernandez-Bustamante, P. Herrera-Añazco, and V. A. Benites-Zapata. 2021. Prognostic value of apolipoproteins in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*. **44**: 102200.
17. Tran-Dinh, A., D. Diallo, S. Delbosc, L. M. Varela-Perez, Q. Dang, B. Lapergue, E. Burillo, J. Michel, A. Levoye, J. Martin-Ventura, and O. Meilhac. 2013. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol*. **169**: 493–511.
18. Wang, G., Q. Zhang, X. Zhao, H. Dong, C. Wu, F. Wu, B. Yu, J. Lv, S. Zhang, G. Wu, S. Wu, X. Wang, Y. Wu, and Y. Zhong. 2020. Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients: an observational study. *Lipids Health Dis*. **19**: 1–7.
19. Tanaka, S., D. Couret, A. Tran-Dinh, J. Duranteau, P. Montravers, A. Schwendeman, and O. Meilhac. 2020. High-density lipoproteins during sepsis: from bench to bedside. *Crit Care*. **24**: 134.
20. Begue, F., S. Tanaka, Z. Mouktadi, P. Rondeau, B. Veeren, N. Diotel, A. Tran-Dinh, T. Robert, E. Vélia,

- P. Mavingui, M. Lagrange-Xélot, P. Montravers, D. Couret, and O. Meilhac. 2021. Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Sci Rep.* **11**: 2291.
21. Yazdanpanah, Y. and French COVID cohort investigators and study group. 2021. Impact on disease mortality of clinical, biological, and virological characteristics at hospital admission and overtime in COVID-19 patients. *J Med Virol.* **93**: 2149–2159.
22. 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. 2022. First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation. *Biomedicines.* **10**: 754.
23. Song, J.-W., S. M. Lam, X. Fan, W.-J. Cao, S.-Y. Wang, H. Tian, G. H. Chua, C. Zhang, F.-P. Meng, Z. Xu, J.-L. Fu, L. Huang, P. Xia, T. Yang, S. Zhang, B. Li, T.-J. Jiang, R. Wang, Z. Wang, M. Shi, J.-Y. Zhang, F.-S. Wang, and G. Shui. 2020. Omics-Driven Systems Interrogation of Metabolic Dysregulation in COVID-19 Pathogenesis. *Cell Metabolism.* **32**: 188-202.e5.
24. Tian, S., W. Hu, L. Niu, H. Liu, H. Xu, and S.-Y. Xiao. 2020. Pulmonary Pathology of Early-Phase 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) Pneumonia in Two Patients With Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* **15**: 700–704.
25. Sorokin, A. V., S. K. Karathanasis, Z.-H. Yang, L. Freeman, K. Kotani, and A. T. Remaley. 2020. COVID-19—Associated dyslipidemia: Implications for mechanism of impaired resolution and novel therapeutic approaches. *The FASEB Journal.* **34**: 9843–9853.
26. Sun, J. T., Z. Chen, P. Nie, H. Ge, L. Shen, F. Yang, X. L. Qu, X. Y. Ying, Y. Zhou, W. Wang, M. Zhang, and J. Pu. 2020. Lipid Profile Features and Their Associations With Disease Severity and Mortality in Patients With COVID-19. *Frontiers in Cardiovascular Medicine.* **7**. [online] <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcvm.2020.584987> (Accessed June 18, 2022).
27. Sampedro-Nuñez, M., N. Aguirre-Moreno, L. García-Fraile Fraile, S. Jiménez-Blanco, C. Knott-Torcal, P. Sanz-Martin, G. Fernández-Jiménez, and M. Marazuela. 2021. Finding answers in lipid profile in COVID-19 patients. *Endocrine.* **74**: 443–454.
28. Chien, J.-Y., J.-S. Jerng, C.-J. Yu, and P.-C. Yang. 2005. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis\*: *Critical Care Medicine.* **33**: 1688–1693.
29. Tanaka, S., J. Stern, D. Bouzid, T. Robert, M. Dehoux, A. Snauwaert, N. Zappella, M. Cournot, B. Lortat-Jacob, P. Augustin, E. Atchade, A. Tran-Dinh, O. Meilhac, and P. Montravers. 2021. Relationship between lipoprotein concentrations and short-term and 1-year mortality in intensive care unit septic patients: results from the HIGHSEPS study. *Annals of Intensive Care.* **11**: 11.
30. Barlage, S., C. Gnewuch, G. Liebisch, Z. Wolf, F.-X. Audebert, T. Glück, D. Fröhlich, B. K. Krämer, G. Rothe, and G. Schmitz. 2009. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med.* **35**: 1877–1885.
31. Mehta, A., and M. D. Shapiro. 2022. Apolipoproteins in vascular biology and atherosclerotic disease. *Nature Reviews Cardiology.* **19**: 168–179.
32. Poynard, T., O. Deckmyn, M. Rudler, V. Peta, Y. Ngo, M. Vautier, S. Akhavan, V. Calvez, C. Franc, J.

- M. Castille, F. Drane, M. Sakka, D. Bonnefont-Rousselot, J. M. Lacorte, D. Saadoun, Y. Allenbach, O. Benveniste, F. Gandjbakhch, J. Mayaux, O. Lucidarme, B. Fautrel, V. Ratzu, C. Housset, D. Thabut, and P. Cacoub. 2020. Performance of serum apolipoprotein-A1 as a sentinel of Covid-19. *PLOS ONE*. **15**: e0242306.
33. Zhu, Z., Y. Yang, L. Fan, S. Ye, K. Lou, X. Hua, Z. Huang, Q. Shi, and G. Gao. 2021. Low serum level of apolipoprotein A1 may predict the severity of COVID-19: A retrospective study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **35**: e23911.
34. Shen, B., X. Yi, Y. Sun, X. Bi, J. Du, C. Zhang, S. Quan, F. Zhang, R. Sun, L. Qian, W. Ge, W. Liu, S. Liang, H. Chen, Y. Zhang, J. Li, J. Xu, Z. He, B. Chen, J. Wang, H. Yan, Y. Zheng, D. Wang, J. Zhu, Z. Kong, Z. Kang, X. Liang, X. Ding, G. Ruan, N. Xiang, X. Cai, H. Gao, L. Li, S. Li, Q. Xiao, T. Lu, Y. Zhu, H. Liu, H. Chen, and T. Guo. 2020. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. *Cell*. **182**: 59-72.e15.
35. Mak, P. A., B. A. Laffitte, C. Desrumaux, S. B. Joseph, L. K. Curtiss, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, and P. A. Edwards. 2002. Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages: A CRITICAL ROLE FOR NUCLEAR LIVER X RECEPTORS  $\alpha$  AND  $\beta^*$ . *Journal of Biological Chemistry*. **277**: 31900–31908.
36. Kimhofer, T., S. Lodge, L. Whiley, N. Gray, R. L. Loo, N. G. Lawler, P. Nitschke, S.-H. Bong, D. L. Morrison, S. Begum, T. Richards, B. B. Yeap, C. Smith, K. G. C. Smith, E. Holmes, and J. K. Nicholson. 2020. Integrative Modeling of Quantitative Plasma Lipoprotein, Metabolic, and Amino Acid Data Reveals a Multiorgan Pathological Signature of SARS-CoV-2 Infection. *J. Proteome Res.* **19**: 4442–4454.
37. Melchior, J. T., S. E. Street, A. B. Andraski, J. D. Furtado, F. M. Sacks, R. L. Shute, E. I. Greve, D. K. Swertfeger, H. Li, A. S. Shah, L. J. Lu, and W. S. Davidson. 2017. Apolipoprotein A-II alters the proteome of human lipoproteins and enhances cholesterol efflux from ABCA1. *Journal of Lipid Research*. **58**: 1374–1385.
38. Zvintzou, E., E. Xepapadaki, C. Kalogeropoulou, S. Filou, and K. E. Kypreos. 2020. Pleiotropic effects of apolipoprotein A-II on high-density lipoprotein functionality, adipose tissue metabolic activity and plasma glucose homeostasis. *J Biomed Res.* **34**: 14–26.
39. Serrano, M., G. Espinosa, A. Lalueza, L. Y. Bravo-Gallego, R. Diaz-Simón, S. Garcinuño, J. Gil-Etayo, J. Moises, L. Naranjo, S. Prieto-González, E. Ruiz-Ortiz, B. Sánchez, A. B. Moreno-Castaño, C. Díaz-Pedroche, O. Viñas-Gomis, R. Cervera, A. Serrano, and the A.-C. 19 S. G. F. on A. Antibodies. 2021. Beta-2-Glycoprotein-I Deficiency Could Precipitate an Antiphospholipid Syndrome-like Prothrombotic Situation in Patients With Coronavirus Disease 2019. *ACR Open Rheumatology*. **3**: 267–276.
40. Kang, J., H. Jang, T. H. Kim, U. Cho, H. Bang, J. Jang, W. Lee, H. Joo, J. Noh, G. Y. Lee, D. H. Shin, C. K. Kang, P. G. Choe, N. J. Kim, M. Oh, M. Song, S. Kwon, F. Veas, and W. B. Park. 2022. Accurate Diagnosis of COVID-19 from Self-Collectable Biospecimens Using Synthetic Apolipoprotein H Peptide-Coated Nanoparticle Assay. *Anal. Chem.* **94**: 17186–17194.
41. Tschopp, J., A. Chonn, S. Hertig, and L. E. French. 1993. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *J Immunol.* **151**: 2159–2165.

42. de Bont, C. M., W. C. Boelens, and G. J. M. Pruijn. 2019. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. *Cell Mol Immunol.* **16**: 19–27.
43. Zhou, Y., Z. Xu, and Z. Liu. 2022. Impact of Neutrophil Extracellular Traps on Thrombosis Formation: New Findings and Future Perspective. *Front Cell Infect Microbiol.* **12**: 910908.
44. Marfia, G., S. Navone, L. Guarnaccia, R. Campanella, M. Mondoni, M. Locatelli, A. Barassi, L. Fontana, F. Palumbo, E. Garzia, G. Ciniglio Appiani, D. Chiumello, M. Miozzo, S. Centanni, and L. Riboni. 2021. Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO Molecular Medicine.* **13**: e13424.
45. Wolfrum, C., M. N. Poy, and M. Stoffel. 2005. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med.* **11**: 418–422.
46. Yao Mattisson, I., and C. Christoffersen. 2021. Apolipoprotein M and its impact on endothelial dysfunction and inflammation in the cardiovascular system. *Atherosclerosis.* **334**: 76–84.
47. Martins-Gonçalves, R., E. D. Hottz, and P. T. Bozza. 2023. Acute to post-acute COVID-19 thromboinflammation persistence: Mechanisms and potential consequences. *Curr Res Immunol.* **4**: 100058.
48. Siwy, J., R. Wendt, A. Albalat, T. He, H. Mischak, W. Mullen, A. Latosinska, C. Lübbert, S. Kalbitz, A. Mebazaa, B. Peters, B. Stegmayr, G. Spasovski, T. Wiech, J. A. Staessen, J. Wolf, and J. Beige. 2021. CD99 and polymeric immunoglobulin receptor peptides deregulation in critical COVID-19: A potential link to molecular pathophysiology? *Proteomics.* **21**: e2100133.
49. Martinez, L. O., S. Najib, B. Perret, C. Cabou, and L. Lichtenstein. 2015. Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* **238**: 89–100.
50. Panfoli, I., and A. Esposito. 2022. Beneficial effect of polyphenols in COVID-19 and the ectopic F1FO-ATP synthase: Is there a link? *J Cell Biochem.* **123**: 1281–1284.
51. Ramachandran, K., S. Maity, A. R. Muthukumar, S. Kandala, D. Tomar, T. M. Abd El-Aziz, C. Allen, Y. Sun, M. Venkatesan, T. R. Madaris, K. Chiem, R. Truitt, N. Vishnu, G. Aune, A. Anderson, L. Martinez-Sobrido, W. Yang, J. D. Stockand, B. B. Singh, S. Srikantan, W. B. Reeves, and M. Madesh. 2022. SARS-CoV-2 infection enhances mitochondrial PTP complex activity to perturb cardiac energetics. *iScience.* **25**: 103722.
52. Conca, W., M. Alabdely, F. Albaiz, M. W. Foster, M. Alamri, M. Alkaff, F. Al-Mohanna, N. Nagelkerke, and R. S. Almaghrabi. 2021. Serum  $\beta$ 2-microglobulin levels in Coronavirus disease 2019 (Covid-19): Another prognosticator of disease severity? *PLOS ONE.* **16**: e0247758. [online] <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247758> (Accessed September 17, 2023).
53. Calvet, J., A. Berenguer-Llargo, M. Gay, M. Massanella, P. Domingo, M. Llop, E. Sánchez-Jiménez, M. Arévalo, J. Carrillo, N. Albiñana, G. Arauz-Garofalo, C. Orellana, J. F. Delgado, A. Serrano, A. Llobell, E. Graell, M. García-Manrique, M. Moreno, C. Galisteo, E. Casado, N. Navarro, A. Gómez, S. Garcia-Cirera, M. Rusiñol, E. Costa, B. Clotet, M. Vilaseca, J. Blanco, and J. Gratacós. 2022. Biomarker candidates for

- progression and clinical management of COVID-19 associated pneumonia at time of admission. *Sci Rep.* **12**: 640.
54. Medjeral-Thomas, N. R., A. Troldborg, A. G. Hansen, R. Pihl, C. L. Clarke, J. E. Peters, D. C. Thomas, M. Willicombe, Y. Palarasah, M. Botto, M. C. Pickering, and S. Thiel. 2021. Protease inhibitor plasma concentrations associate with COVID-19 infection. *Oxf Open Immunol.* **2**: iqab014.
55. Geyer, P. E., F. M. Arend, S. Doll, M.-L. Louiset, S. Virreira Winter, J. B. Müller-Reif, F. M. Torun, M. Weigand, P. Eichhorn, M. Bruegel, M. T. Strauss, L. M. Holdt, M. Mann, and D. Teupser. 2021. High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion. *EMBO Molecular Medicine.* **13**: e14167.
56. Ballout, R. A., H. Kong, M. Sampson, J. D. Otvos, A. L. Cox, S. Agbor-Enoh, and A. T. Remaley. 2021. The NIH Lipo-COVID Study: A Pilot NMR Investigation of Lipoprotein Subfractions and Other Metabolites in Patients with Severe COVID-19. *Biomedicines.* **9**: 1090.
57. Hu, X., D. Chen, L. Wu, G. He, and W. Ye. 2020. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clinica Chimica Acta.* **510**: 105–110.



## C. Discussion et perspectives

Dans nos différentes études, nous avons globalement montré que le protéome des HDL et des lipoprotéines à Apo B des patients était altéré durant une COVID-19 sévère. De plus, nous avons montré des différences dans l'apolipoprotéome plasmatique entre les patients décédés et survivants du COVID-19.

Concernant l'étude comparative de la composition protéique des HDL des patients COVID-19 en réanimation et celle des HDL de sujets sains, nous avons identifié par spectrométrie de masse 83 protéines associées aux HDL (**Article 2**). Cependant, après validation des peptides par les différents scores de confiance, seules 32 protéines ont été retenues pour la quantification dans les HDL des patients. L'importante altération du protéome de ces nanoparticules que nous observons ici se caractérise par un enrichissement en protéines de la phase aiguë comme la SAA-1, la SAA- 2, l'AAT, la chaîne bêta du fibrinogène et l'AGP-1 chez les patients COVID-19. Ces protéines sont clairement associées à la sévérité de la maladie, comme l'indique une méta-analyse effectuée sur les concentrations de SAA et qui montre une association positive entre les concentrations de SAA, la sévérité et la mortalité de la COVID-19 (**Zinellu et al. 2021**). Une récente revue confirme l'association de la SAA avec la sévérité de la COVID-19 et l'augmentation de la concentration en fibrinogène contribue au thrombo-embolisme au cours de la COVID-19 (**Mantovani and Garlanda 2023**).

Une autre étude pilote a montré une association entre la sévérité de la COVID-19 et les concentrations en AAT et en AGP-1 qui ont alors été considérés comme marqueurs plasmatiques de sévérité de la COVID-19 (**Beimdiek et al. 2022**). L'enrichissement des HDL en protéines de la phase aiguë est causé par une surproduction de ces protéines par le foie en réponse à la tempête cytokinique provoquée le SARS-CoV-2 (**Buck et al. 2016; Beimdiek et al. 2022**).



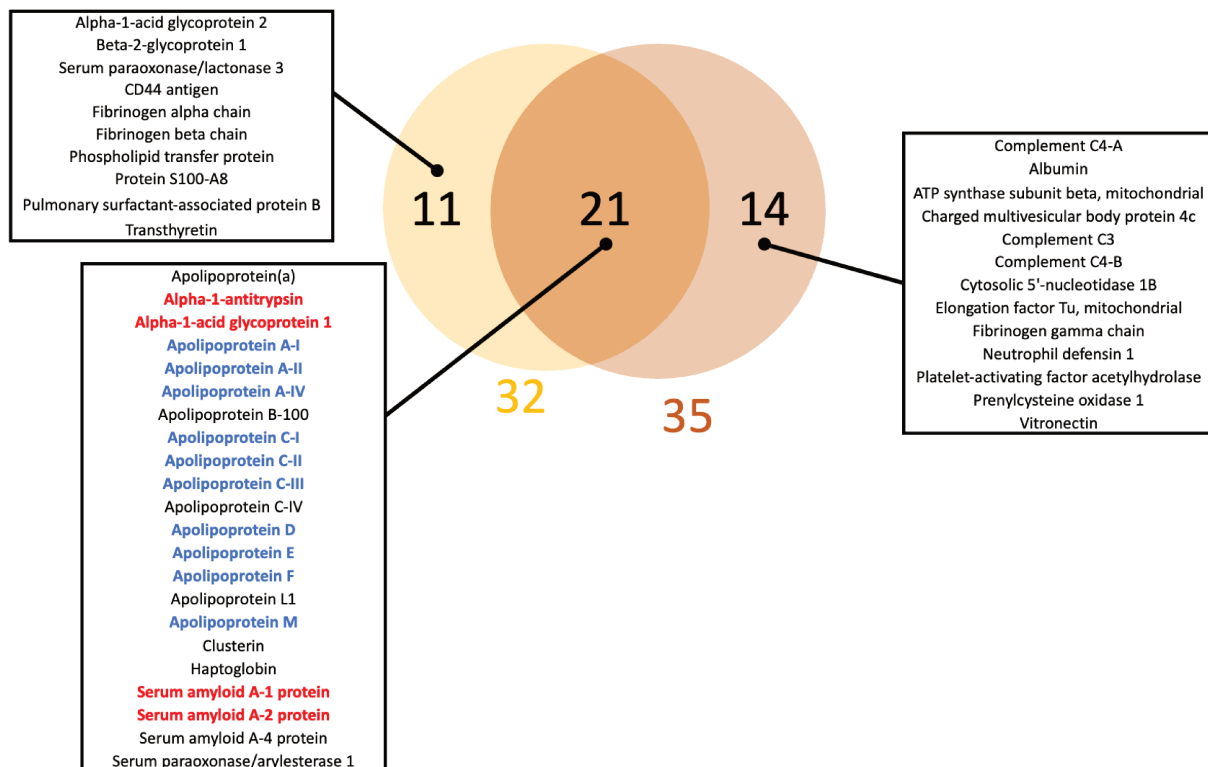
Au-delà de l'enrichissement en protéines de la phase aiguë, les HDL des patients COVID-19 sont appauvries en apolipoprotéines (Apo A-I, A-II...) et en enzymes antioxydantes (PON1, PON3). Certaines apolipoprotéines, notamment l'Apo A-I confèrent aux HDL leurs propriétés vasculo-protectrices et ici, nous avons montré que chez les patients COVID-19, sa concentration est significativement diminuée contribuant à la dysfonction des particules. L'appauvrissement en enzymes antioxydantes sur les HDL des patients, comme les paraoxonases conduit également à une perte des propriétés antioxydantes de ces dernières. D'ailleurs, nous avons montré au cours de notre étude que les HDL provenant de patients COVID-19 perdent effectivement leur capacité à inhiber l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  et ainsi qu'à maintenir les jonctions entre les cellules endothéliales via la protéine de jonction serrée VE-cadhérine. L'enrichissement en SAA des HDL des patients COVID-19 contribue également à la perte de fonction de ces nanoparticules (Schuchardt et al. 2019). La dysfonction des HDL de patients COVID-19 peut donc contribuer à la perméabilité de l'endothélium pouvant causer par la suite une défaillance d'organes. Cette perméabilité accrue de l'endothélium durant la COVID-19 est causée par l'hyper-inflammation et le stress oxydant (Xu et al. 2023). Cette hyper-inflammation cause une diminution de la production d'apolipoprotéines par le foie et en plus de cela, la SAA vient déplacer l'Apo A-I sur les HDL afin de la remplacer contribuant ainsi à une diminution drastique de molécules d'Apo A-I dans les particules HDL (Benditt and Eriksen 1977; Coetzee et al. 1986; Kotani et al. 2009; Wilson et al. 2018).

Dans la continuité de la seconde étude, nous avons évalué les modifications du protéome des lipoprotéines à Apo B ainsi que les sous-populations de LDL provenant des patients COVID-19 en service de réanimation (Article 3). Nous avons remarqué que les patients COVID-19 présentent une distribution athérogène des lipoprotéines. En effet, une augmentation des niveaux haut en VLDL, IDL et des LDL petites et denses a été observée chez les patients COVID-19 comparée à ceux des sujets contrôles. Parallèlement, les niveaux en grosses LDL et en HDL sont diminués chez les patients COVID-19. Les niveaux élevés en TG et en lipoprotéines riches en TG comme les VLDL pourraient contribuer à la production de LDL petites et denses. Toutefois, il faut rappeler que la production de ces sdLDL est aussi dépendante de la CETP, de l'HL et de la LPL (Duran et al. 2020; Hori et al. 2021).

Jusqu'à présent, il n'a pas été établi de corrélation entre les concentrations de niveaux de LDL petites et denses et la sévérité de l'infection virale. La majorité des recherches portant sur les sous-populations de LDL se sont focalisées sur leur association avec le développement de maladies cardiovasculaires (Ivanova et al. 2017). Toutefois, une étude portant sur des patients souffrant de leptospirose a montré un profil de distribution des LDL similaires à celui obtenu sur les patients COVID-19 (Apostolou et al. 2010). La même observation a été faite dans une étude s'intéressant à une infection par le virus d'Epstein-Barr, dans laquelle des taux élevés en sdLDL étaient associés à l'infection (Gazi et al. 2011). Il serait donc pertinent d'étudier la distribution des LDL en fonction de la sévérité de l'infection qu'elle soit virale ou bactérienne. Cette étude permettra d'établir un possible lien entre ce profil de distribution et la sévérité des infections.

La COVID-19 est associée à un stress oxydant important, en plus de l'inflammation. Étant donné que nous observons des niveaux élevés des LDL petites et denses et sachant que ces LDL sont plus sujettes aux phénomènes oxydatifs, nous avons souhaité évaluer l'impact de ce stress sur les lipoprotéines. Pour cela, nous avons mesuré la peroxydation lipidique par le test de TBARS (substances réactives à l'acide thiobarbiturique) ainsi que de la présence de protéines carbonylées dans les lipoprotéines à Apo B, notamment par la technique de l'Oxyblot. De façon surprenante, nous n'avons observé aucune marque d'oxydation tant par la technique de TBARS que par l'Oxyblot sur ces lipoprotéines.

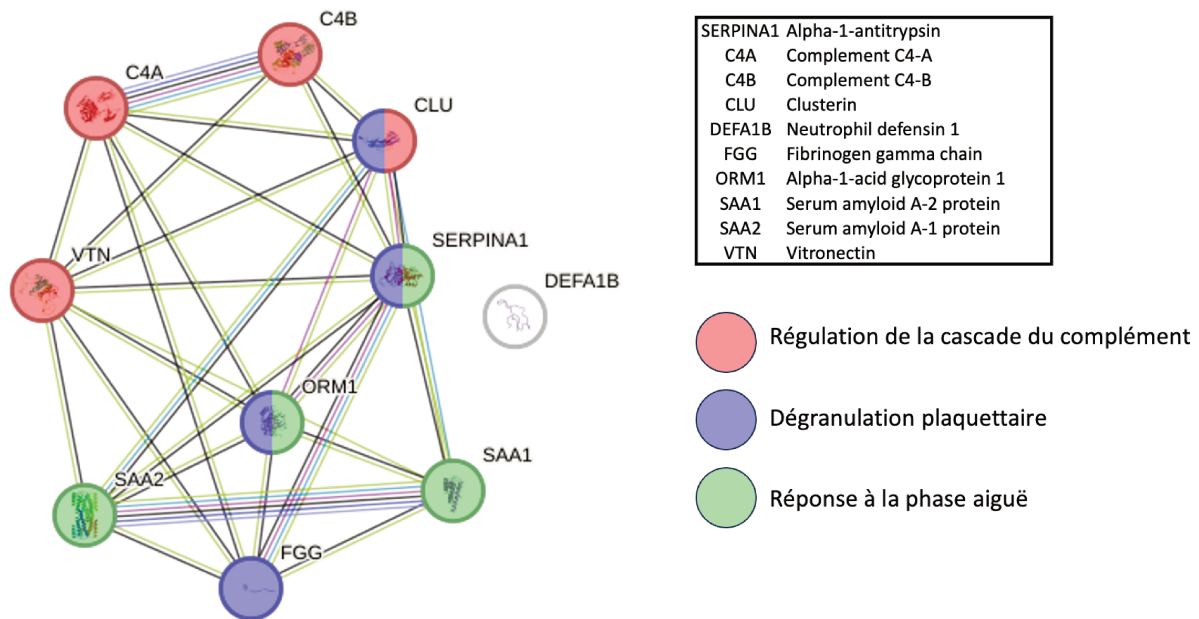
Par ailleurs, nous avons analysé le protéome des lipoprotéines à Apo B par une approche sans *a priori* par spectrométrie de masse. Nous avons identifié 52 protéines associées au LDL, dont 35 réellement associées après vérification des scores de confiance des peptides identifiés et quantifiés. Certaines de ces protéines sont partagées par les HDL des patients COVID-19 (**Figure 33**). En effet, nous constatons que les protéines de la phase aiguë qui sont retrouvées augmentées dans les HDL le sont aussi dans les lipoprotéines à Apo B. Ces protéines de la phase aiguë, notamment les SAA, vont circuler principalement liées aux lipoprotéines (**Buck et al. 2016**).



Le cercle jaune représente le nombre de protéines quantifiées dans les HDL et le cercle marron celles quantifiées dans les lipoprotéines à Apo B. Les protéines en rouges sont les protéines augmentées à la fois dans les lipoprotéines à Apo B et dans les HDL des patients COVID-19. Les protéines en bleu sont les protéines diminuées à la fois dans les lipoprotéines à Apo B et les HDL chez les patients COVID-19.

**Figure 33. Diagramme de Venn des protéines identifiées et quantifiées associées aux HDL et LDL des patients COVID-19 par l'analyse en NanoLC-MS/MS.**

En plus des protéines de la phase aiguë, nous avons observé, dans les lipoprotéines à Apo B, une augmentation des protéines impliquées dans la régulation du complément comme les C4A, C4B et la vitronectine (**Figure 34**). L'augmentation de ces protéines contribue à l'activation des voies du complément et notamment celles de l'opsonisation via les compléments C4A et C4B et de la clairance des cellules apoptotiques (**Sarma and Ward 2011**).

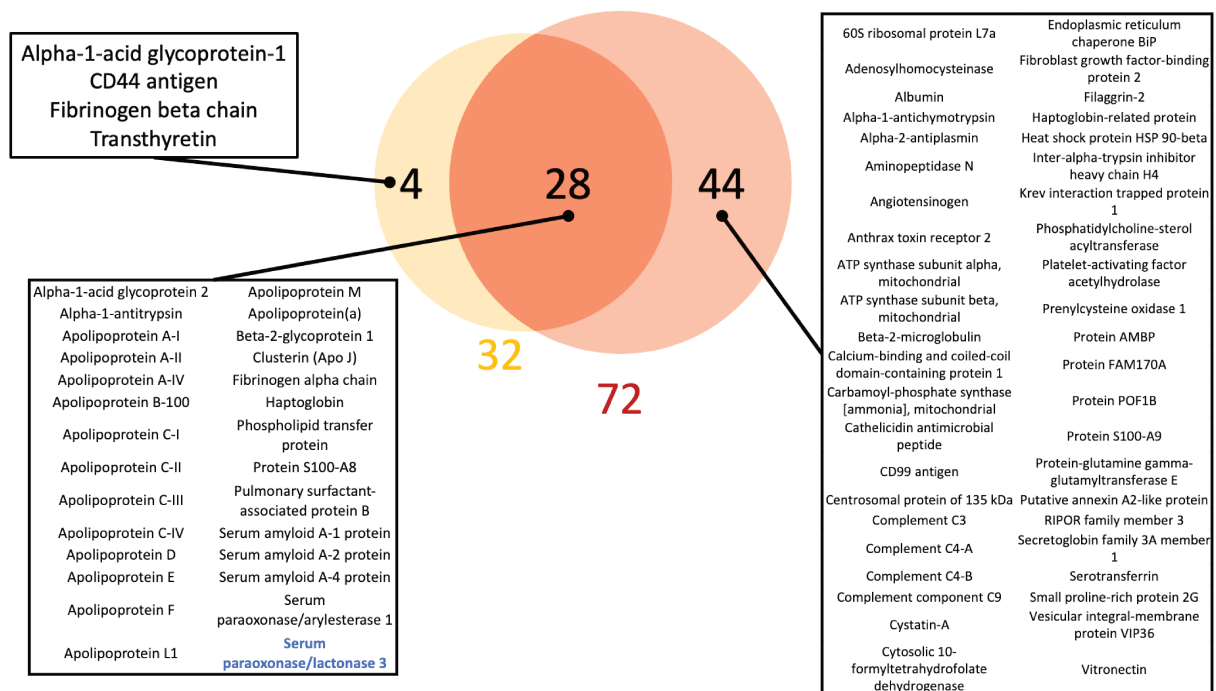


**Figure 34. Réseau d'association des processus biologiques des protéines des lipoprotéines à Apo B des patients COVID-19.**

Le protéome des lipoprotéines à Apo B est également appauvri en apolipoprotéines comme celui des HDL avec certaines apolipoprotéines communes comme les Apo A-IV, Apo C (I, II, III), Apo D, Apo E, Apo F et Apo M qui sont diminuées dans les deux types de particules. La diminution de ces apolipoprotéines démontre bien une altération du métabolisme des lipoprotéines lors d'une infection par le SARS-CoV-2. La diminution des concentrations en apolipoprotéines est possiblement associée aux dysfonctions hépatiques qui touchent les patients COVID-19 (**Thandassery et al. 2022**). Il serait pertinent d'approfondir nos analyses et de réaliser une ultracentrifugation supplémentaire afin d'isoler spécifiquement les LDL petites et denses des autres lipoprotéines. En effet, une analyse de la composition protéique spécifique des LDL petites et denses permettra d'enrichir nos connaissances sur le protéome de ces nanoparticules pro-athérogènes notamment en situation d'infection. Il serait pertinent de déterminer si les LDL participent à la pathogenèse de la COVID-19, par le biais de tests *in vitro* sur des cellules hépatiques co-stimulées par le virus SARS-CoV-2 et les différentes sous-populations de LDL. Ainsi, le rôle des différents types de particules de LDL doit faire l'objet d'une recherche approfondie dans le contexte inflammatoire aigu comme la COVID-19.

Enfin, nous avons déterminé les modifications des HDL et de son apolipoprotéome en situation de COVID-19 ([Article 4](#)).

Nous avons optimisé la préparation de l'échantillon et l'isolement des HDL entre l'article 2 et l'article 4. Au cours de l'étude de l'[article 2 \(Begue et al. 2021\)](#), nous avons identifié 83 protéines associées aux HDL par spectrométrie de masse. Cependant, après avoir vérifié les scores de confiance des peptides, seules 32 protéines avaient été retenues comme associées aux HDL et ont été quantifiées. L'optimisation de notre protocole de préparation des échantillons pour la NanoLC-MS/MS, par l'ajout d'une étape de dénaturation par la chaleur et par l'urée a permis d'améliorer de 15% le nombre de peptides identifiés. Ainsi, pour l'étude FRENCHCOVID, nous avons identifié 97 protéines dont 72 ont été associées aux HDL et ont été quantifiées. De plus, 88% des protéines que nous avons identifié et quantifié dans les HDL des patients de l'étude *Aposize* sont également retrouvées dans l'étude FRENCHCOVID ([Figure 35](#)).



Le cercle jaune représente le nombre de protéines quantifiées sans étape de dénaturation et le cercle rouge celles identifiées avec les étapes supplémentaires de dénaturation des HDL. Les protéines en bleu sont les protéines diminuées à la fois dans les HDL des patients COVID-19 (cohorte *Aposize*) et les HDL des patients non-survivants de leur COVID-19 (cohorte FRENCHCOVID).

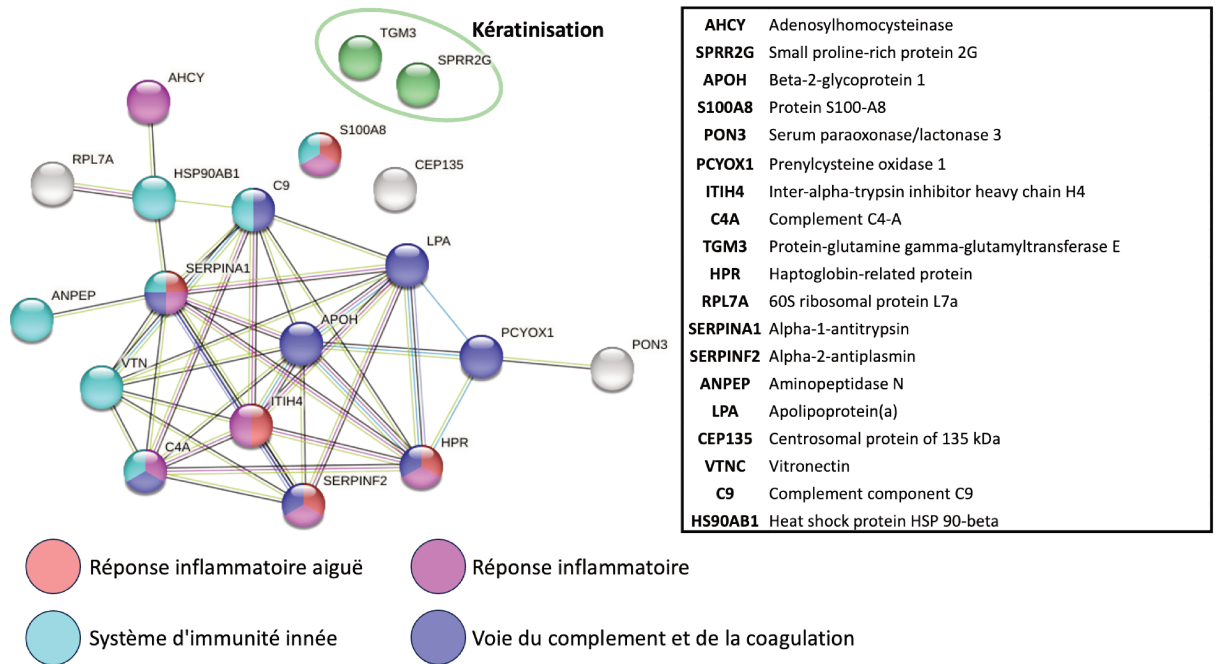
**Figure 35. Diagramme de Venn des protéines identifiées et quantifiée associées aux HDL selon la méthode de préparation des échantillons pour l'analyse en NanoLC-MS/MS.**

L'optimisation du protocole d'isolement des HDL entre les études de l'article 2 et de l'article 4 avec l'ajout d'une étape d'élimination de l'albumine en FPLC après l'ultracentrifugation, peut engendrer une perte de protéines associées aux HDL. Cependant, nous n'avons pas de certitudes dans le cas de notre étude. Nous n'avons pas réalisé l'analyse du protéome des HDL par spectrométrie de masse avant l'étape en FPLC et après afin de d'observer l'impact de la FPLC sur la composition protéique de ces HDL.

Le protéome des HDL des patients n'ayant pas survécu au COVID-19 est enrichi en protéines ayant diverses fonctions immunitaires ou participant au catabolisme des HDL. Par exemple, l'antigène CD99 joue un rôle dans l'adhésion des lymphocytes. Cette protéine est localisée majoritairement sur les lymphocytes T et les cellules endothéliales. Les HDL viendraient ainsi capter cette protéine contribuant à une diminution des concentrations en CD99 antigènes dans le sang. Les niveaux de cette protéine particulièrement bas chez les patients COVID-19 présentant des symptômes graves, indiquent une réduction de l'intégrité endothéliale et du recrutement des monocytes, des neutrophiles et des cellules T (Siwy et al. 2021). Certaines protéines impliquées dans la réponse inflammatoire aiguë et dans les voies du complément et de la coagulation comme l'AAT, l'*haptoglobin related protein*, les C4A et C9 sont moins abondantes dans les HDL des patients décédés par rapport aux survivants (Figure 36). Ces protéines sont normalement retrouvées augmentées durant la période inflammatoire du COVID-19 (Medjeral-Thomas et al. 2021; Geyer et al. 2021). Une étude récente a montré que les patients COVID-19 sévères présentaient des taux en AAT plus bas que ceux admis en réanimation pour une pneumonie aiguë sans lien avec la COVID-19 (Pertzov et al. 2022). L'AAT présente des propriétés anti-inflammatoires et potentiellement antivirales (Bai et al. 2023). Ainsi, la diminution de l'AAT contribue possiblement à l'expansion de l'infection contribuant à des formes graves de la COVID-19. Dans l'article 2, nous avons observé une augmentation de l'AAT chez les patients souffrant de COVID-19 sévère. Cette différence entre les deux études pourrait s'expliquer par la disparité des groupes de comparaison. Dans l'article 2, la comparaison a été effectuée entre des sujets sains et des patients atteints de COVID-19 sévère, alors que dans l'article 4, la comparaison est faite entre des patients survivants et non-survivants de la COVID-19. Ainsi, l'augmentation de l'AAT dans les HDL des patients COVID-19 de notre article 2 suggère une réponse à l'infection qui n'est pas visible dans l'article 4 (Figure 36). Nous avons aussi observé une diminution en PON-3 dans les HDL des patients COVID-19 et celle-ci est plus marquée chez les patients ne survivant pas. La perte en PON-3 des HDL conduit clairement à une perte de ses fonctions antioxydantes (Marsillach et al. 2015). Si la modification du protéome des HDL est



potentiellement causée par la réponse à la phase aiguë, les mécanismes restent encore peu connus. De plus, l'altération de la composition protéique de ces HDL conduit à une dysfonction de ces nanoparticules. Comme pour l'étude précédente, il aurait été pertinent de réaliser des tests de fonctionnalité de ces HDL *in vitro*. Le but étant de réaliser par la suite, des corrélations entre la fonctionnalité et la composition protéique de ces HDL, afin d'établir un profil de protéome reflétant la dysfonction de ces HDL.



**Figure 36. Réseau d'association des processus biologiques des protéines moins abondantes des HDL de patients COVID-19 non-survivant.**

Dans la continuité de la partie 1, nous avons analysé l'apolipoprotéome plasmatique des patients en fonction de leur survie ou non au COVID-19. J'ai résumé les résultats obtenus dans les deux études sur l'apolipoprotéome dans le [tableau 9](#).

**Tableau 9. Résumé des résultats sur l'apolipoprotéome plasmatique**

	Article 1		Article 4	
	Contrôle	COVID-19	COVID-19 survivants	COVID-19 non-survivants
Apo (a)	60,54 ± 33,08	49,37 ± 25,28	75 ± 40,58	61,22 ± 20,55
Apo A-I	99,91 ± 30,31	52 ± 23,72 <sup>\$\$\$\$</sup>	55,52 ± 18,47	45,72 ± 20,8
<b>Apo A-II</b>	14,04 ± 6,775	6,43 ± 3,99 <sup>\$\$\$\$</sup>	4,68 ± 3,77	2,30 ± 1,51*
Apo A-IV	15,35 ± 7,894	6,30 ± 4,63 <sup>\$\$\$\$</sup>	13,25 ± 11	7,38 ± 6,33
Apo B100	79,78 ± 34,4	77,05 ± 31,11	46,52 ± 30,16	29,04 ± 18,22
<b>Apo C-I</b>	4,43 ± 4,21	2,19 ± 1,57 <sup>§</sup>	2,29 ± 1,72	0,87 ± 0,62**
<b>Apo C-II</b>	4,34 ± 4,26	2,19 ± 1,57 <sup>§</sup>	1,64 ± 0,99	1,00 ± 0,58*
Apo C-III	0,88 ± 1,06	0,76 ± 0,72	0,21 ± 0,18	0,09 ± 0,08**
Apo D	1,88 ± 1,25	1,44 ± 0,93 <sup>§</sup>	2,98 ± 1,93	2,28 ± 1,77
Apo E	4,55 ± 1,6	5,43 ± 1,67 <sup>§</sup>	4,48 ± 1,35	3,92 ± 1,12
<b>Apo H</b>	15,94 ± 5,65	9,41 ± 3,75 <sup>\$\$\$\$</sup>	11,45 ± 3,45	9,28 ± 2,52*
<b>Apo J</b>	15,32 ± 6,50	9,30 ± 3,90 <sup>\$\$\$\$</sup>	13,55 ± 3,99	11,03 ± 2,81*
Apo L1	7,70 ± 2,57	7,69 ± 3,16	6,43 ± 2,54	5,18 ± 2,17
<b>Apo M</b>	6,90 ± 3,94	3,67 ± 1,97 <sup>\$\$\$\$</sup>	2,90 ± 1,09	2,12 ± 0,63*
<b>LCAT</b>	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,05 <sup>\$\$\$\$</sup>	0,188 ± 0,04	0,15 ± 0,05*

Les concentrations en rouge et en bleu représentent une augmentation et une diminution des apolipoprotéines, respectivement. \$  $p < 0,05$ , \$\$\$\$\$  $p < 0,0001$  pour la comparaison contrôles vs. COVID-19. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  pour la comparaison survivant vs. non-survivant de la COVID-19.

Nous constatons tout d'abord que les Apo A-II, C (I, II), H, J, M et la LCAT montrent la même tendance, c'est-à-dire des concentrations plus basses par rapport à leurs groupes contrôles respectifs. La réduction de l'Apo A-II peut être associée à la diminution du nombre de particules de HDL circulantes. La diminution de la concentration de la LCAT contribue à une diminution de la formation de HDL sphériques fonctionnelles conduisant à une diminution des concentrations de HDL-C. La diminution en Apo C démontre bien une perturbation du métabolisme des lipoprotéines riches en TG, contribuant à la sécrétion et la formation de VLDL ([Ginsberg et al. 2021](#)). Cette augmentation de VLDL a été observée par l'analyse de la distribution des sous-populations au cours de notre troisième étude. Les Apo H et M sont aussi retrouvées diminuées au cours de la COVID-19 et particulièrement chez les patients non-survivants. Comme nous l'avons mentionné dans la synthèse bibliographique, la concentration en Apo M est généralement associée à celle de la S1P. Ainsi, une diminution de l'apolipoprotéine M conduit normalement à une diminution de la S1P ([Kiyozuka et al. 2023](#)). Lorsque cette dernière interagit avec son récepteur S1PR1, elle améliore la barrière de la paroi vasculaire permettant de moduler la perméabilité vasculaire ([Wang and Dudek 2009](#)).



Ainsi, la diminution des concentrations ApoM/S1P peut contribuer à l'augmentation de la perméabilité vasculaires observée durant la COVID-19 (Teuwen et al. 2020). Les causes de la diminution des concentrations des différentes apolipoprotéines au cours de la COVID-19 restent mal connues. Plusieurs hypothèses ont été avancées notamment la diminution de la sécrétion des apolipoprotéines par le foie à cause de l'inflammation aiguë en lien avec la COVID-19, l'hémodilution des patients en service de réanimation ou encore la fuite plasmatique.

#### **Nos études comprennent quelques limites :**

Premièrement, l'ensemble de nos études ont été réalisées sur un échantillonnage de patients relativement faibles, mais ce n'a pas empêché d'observer des modifications significatives entre les groupes. Deuxièmement, la majorité de nos études sont monocentriques et il aurait été plus pertinent de réaliser des études multicentriques avec un nombre de patients plus important afin de conforter nos observations. Enfin, une dernière limite est l'absence d'échantillons de patients prélevés durant toute la progression de la maladie. En effet, nous disposons uniquement de prélèvements lors de leur admission en service de réanimation. Toutefois, ces échantillons prélevés à ce temps unique ont permis de déterminer des marqueurs discriminants de sévérité de la COVID-19.

Nous pouvons conclure que la composition protéique des HDL est fortement altérée au cours de la COVID-19. Cette altération se traduit notamment par une diminution des apolipoprotéines lorsque les patients sont infectés par la COVID-19 et de façon plus marquée lorsque ceux-ci ne survivent pas à leur maladie. En plus des apolipoprotéines, une diminution en enzymes antioxydantes telles que PON1 et PON3 est observée au cours de la COVID-19. La diminution de ces enzymes contribue à une perte des propriétés antioxydantes des HDL. Parallèlement, les HDL s'enrichissent en protéines de la phase aiguë (SAA, AGP-1, AAT, fibrinogène) au cours de l'infection virale. La surproduction hépatique de ces protéines contribue à l'enrichissement des HDL et le remodelage de la composition des HDL contribue à une perte de leurs fonctions anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. Cette dysfonction de ces HDL laisse présager une contribution négative de leur part à la perméabilité vasculaire et à l'inflammation.

Dans la continuité de nos études, il serait pertinent de comparer l'impact d'un sepsis bactérien à celui du sepsis viral tel que la COVID-19. Le but étant d'évaluer si les modifications de l'apolipoprotéome, de la composition et de la fonctionnalité de ces lipoprotéines sont dépendantes de l'origine du sepsis.

L'exploration du protéome des HDL permet d'identifier des biomarqueurs, et d'identifier des protéines caractéristiques de la fonctionnalité des HDL. En effet, il est important d'étudier la qualité de ces HDL en plus de leur quantité. Au-delà de la protéomique, les HDL sont également composées de lipides, tels que les phospholipides, les sphingolipides et les lipides neutres qui déterminent également les fonctions des HDL. Actuellement, nous avons réalisé uniquement l'analyse du protéome des HDL au cours de la COVID-19. En perspective, une étude lipidomique des HDL de ces patients COVID-19 serait intéressante, car elle permettrait d'observer des modifications du lipidome des HDL et d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

Les HDL sont la cible de modifications au cours de la COVID-19 et qui font d'elles une cible thérapeutique intéressante. Une approche thérapeutique à explorer consisterait à administrer par perfusion des HDL mimétiques pour pallier l'altération quantitative et qualitative des HDL endogènes.



**PARTIE III. PREMIÈRE  
ADMINISTRATION DE  
NANOPARTICULES D'APO A-I  
RECOMBINANTE CHEZ UNE  
PATIENTE SOUFFRANT D'UNE  
COVID-19 SÉVÈRE**



## A. Introduction et objectifs

Au cours de nos précédentes parties, nous avons constaté une diminution drastique des concentrations en HDL-C et une altération importante des concentrations plasmatiques en apolipoprotéines chez les patients COVID-19. De plus, la majorité de ces apolipoprotéines diminuées sont principalement transportées par les HDL. Nous avons aussi démontré une modification significative de la composition en protéines des HDL conduisant à une perte de leurs fonctions durant la COVID-19.

Les HDL possèdent des propriétés pléiotropes protectrices (**Chapman 2022**). La concentration de HDL-C est inversement corrélée avec la mortalité de la COVID-19 (**Tanaka et al. 2020c; Yue et al. 2021**). L'ensemble de ces données suggère une possible action bénéfique d'administrer des HDL mimétiques, à des fins thérapeutiques chez les patients COVID-19. Actuellement, plusieurs nanoparticules d'Apo A-I qui ont été mises au point comme les CER-001, les CSL-112 ou encore l'ETC-642 qui ont d'ores et déjà montré qu'elles étaient sûres pour une utilisation chez l'homme. De plus, ces HDL mimétiques possèdent les mêmes propriétés que les HDL plasmatiques qui sont anti-inflammatoires et antioxydantes. De ce fait l'utilisation de HDL mimétiques pour le traitement de la COVID-19 est une approche thérapeutique à évaluer.

Au cours de cette dernière partie, j'ai participé à une étude visant à évaluer les effets d'injections répétées de nanoparticules d'Apo A-I recombinantes, les CER-001, chez une patiente souffrant d'une forme grave de COVID-19 (autorisation obtenue à titre compassionnel)

Nous avons pu bénéficier d'échantillons plasmatiques de cette patiente ayant reçu le traitement reposant sur des perfusions répétées de CER-001 (10 mg/kg). La patiente a reçu une perfusion de CER-001 toutes les 12h pendant trois jours. Les échantillons de plasma ont été prélevés avant la perfusion de CER-001, puis trois heures post-injection, sur toute la durée du traitement. Les jours post-traitement, un seul prélèvement a été réalisé.

Nous avons ensuite examiné les changements des profils lipidiques avant, pendant et après le traitement. Pour évaluer la métabolisation des CER-001, nous avons quantifié les différentes apolipoprotéines plasmatiques par spectrométrie de masse et évalué la distribution des lipoprotéines par la technique de migration électrophorétique sur tube de gel de type "Lipoprint". Nous avons aussi évalué l'effet anti-inflammatoire des perfusions de CER-001 en mesurant différentes cytokines dans le plasma. Enfin, nous avons isolé les HDL

du plasma de la patiente pour étudier l'impact des perfusions de CER-001 sur la composition protéique des HDL.

## **B. Résultats**

L'ensemble des résultats obtenus ont été valorisés dans un case report intitulé « **First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation** » et publié dans le journal *Biomedicines* en 2022.







# Article 5

Biomedicines . 2022. DOI: 10.3390/biomedicines10040754

## First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation

Sébastien TANAKA †, **Floran BEGUE** †, Bryan VEEREN, Alexy TRAN-DINH, Tiphaine ROBERT, Parvine TASHK, Brice LORTAT-JACOB, Dorothée FAILLE, Luc de CHAISEMARTIN, Nathalie ZAPPELLA, Enora ATCHADE, Laura KRAMER, Philippe MONTRAVERS and Olivier MEILHAC

† Les deux auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.





Case Report

# First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation

Sébastien Tanaka <sup>1,2,\*</sup>, Floran Begue <sup>2,†</sup>, Bryan Veeren <sup>2</sup>, Alexy Tran-Dinh <sup>1,3,4</sup>, Tiphaine Robert <sup>5</sup>, Parvine Tashk <sup>1</sup>, Brice Lortat-Jacob <sup>1</sup>, Dorothée Faille <sup>3,4,6</sup>, Luc de Chaisemartin <sup>7,8</sup>, Nathalie Zappella <sup>1</sup>, Enora Atchade <sup>1</sup>, Laura Kramer <sup>9</sup>, Philippe Montravers <sup>1,3,10</sup> and Olivier Meilhac <sup>2,11,\*</sup>

- <sup>1</sup> AP-HP, Service d’Anesthésie-Réanimation, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France; alexy.trandinh@aphp.fr (A.T.-D.); parvine.tashk@aphp.fr (P.T.); brice.lortat-jacob@aphp.fr (B.L.-J.); nathalie.zappella@aphp.fr (N.Z.); enora.atchade@aphp.fr (E.A.); philippe.montravers@aphp.fr (P.M.)
- <sup>2</sup> INSERM, UMR 1188 Diabète Athérombose Réunion Océan Indien (DÉTRO), Université de La Réunion, 97400 Saint-Denis, France; floran.begue@univ-reunion.fr (F.B.); bryan.veeren@univ-reunion.fr (B.V.)
- <sup>3</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université de Paris, 75006 Paris, France; dorothee.faille@aphp.fr
- <sup>4</sup> INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, 75018 Paris, France
- <sup>5</sup> AP-HP, Service de Biochimie, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France; tiphaine.robert@aphp.fr
- <sup>6</sup> AP-HP, Département d’Hématologie Biologique, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France
- <sup>7</sup> AP-HP, Département d’Immunologie, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France; luc.de-chaisemartin@u-psud.fr
- <sup>8</sup> Inserm, Inflammation, Microbiome, Immunosurveillance, Université Paris-Saclay, 92290 Châtenay-Malabry, France
- <sup>9</sup> AP-HP, Service de Pharmacie, CHU Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France; laura.kramer@aphp.fr
- <sup>10</sup> INSERM UMR 1152—PHERE, Physiopathology and Epidemiology of Respiratory Diseases, 75018 Paris, France
- <sup>11</sup> CHU de La Réunion, CIC-EC 1410, 97400 Saint-Denis, France
- \* Correspondence: sebastien.tanaka@aphp.fr (S.T.); olivier.meilhac@inserm.fr (O.M.); Tel.: +33-140-255-112 (S.T.); +33-2622-6293-8811 (O.M.)
- † These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Tanaka, S.; Begue, F.; Veeren, B.; Tran-Dinh, A.; Robert, T.; Tashk, P.; Lortat-Jacob, B.; Faille, D.; de Chaisemartin, L.; Zappella, N.; et al. First Recombinant High-Density Lipoprotein Particles Administration in a Severe ICU COVID-19 Patient, a Multi-Omics Exploratory Investigation. *Biomedicines* **2022**, *10*, 754. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040754>

Academic Editor: Toshihiro Kita

Received: 9 February 2022

Accepted: 20 March 2022

Published: 23 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:** High-density lipoproteins (HDLs) have multiple endothelioprotective properties. During SARS-CoV-2 infection, HDL-cholesterol (HDL-C) concentration is markedly reduced, and studies have described severe impairment of the functionality of HDL particles. Here, we report a multi-omic investigation of the first administration of recombinant HDL (rHDL) particles in a severe COVID-19 patient in an intensive care unit. Plasma ApoA1 increased and HDL-C decreased after each recombinant HDL injection, suggesting that these particles were functional in terms of reverse cholesterol transport. The proportion of large HDL particles also increased after injection of recombinant HDL. Shotgun proteomics performed on HDLs isolated by ultracentrifugation indicated that ApoA1 was more abundant after injections whereas most of the pro-inflammatory proteins identified were less abundant. Assessment of Serum amyloid A-1, inflammatory markers, and cytokines showed a significant decrease for most of them during recombinant HDL infusion. Our results suggest that recombinant HDL infusion is feasible and a potential therapeutic strategy to be explored in COVID-19 patients.

**Keywords:** COVID-19; lipoprotein; HDL; proteomics; CER-001; case-report; sepsis; cytokines; inflammation

## 1. Introduction

High-density lipoproteins (HDL) belong to a family of particles characterized by their ability to transport cholesterol from peripheral tissues to the liver, which confers

them cardiovascular protective effects [1,2]. In addition to their reverse cholesterol transport function, HDLs exhibit pleiotropic endothelioprotective properties, including anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-thrombotic, and antioxidant functions [3–8]. HDLs also have the ability to neutralize lipopolysaccharide (LPS) and promote its clearance, giving them anti-infectious effects [9–11]. During acute inflammatory states, recent clinical studies have highlighted the fact that HDL-cholesterol (HDL-C) levels are low [12–16] and HDL particles are qualitatively altered leading to their dysfunction [17–21], which prevent them from exerting their protective functions in pathologies such as sepsis where endothelial function is highly compromised. In this context, preclinical studies have investigated the interest of injecting recombinant or reconstituted HDLs in animal models of sepsis [22–28]. These studies have highlighted the interest of these injections with a drastic reduction in mortality, an improvement in organ dysfunctions and inflammation markers, making it possible to envisage future clinical trials in septic patients [29].

Coronavirus 2019 disease (COVID-19), which is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was first detected in December 2019, declared a global pandemic in March 2020, and has caused more than 5 million deaths worldwide [30,31]. Several studies, including ours [32], have reported significant changes in the lipid profile of COVID-19 patients.

As in bacterial sepsis, HDL-C concentration is low during COVID-19 and several studies have shown a correlation between this low HDL-C level and morbi-mortality [32–36]. In a recent study in severe COVID-19 patients compared to controls, our team showed major changes in the HDL proteome with, in particular, less apolipoprotein A-I and paraoxonase 1 and more pro-inflammatory proteins such as serum amyloid A (SAA-1 and 2) [37]. In addition, HDLs from patients were less protective in TNF $\alpha$ -stimulated endothelial cells and inhibition of apoptosis by HDL isolated from COVID-19 patients was blunted relative to HDLs from controls. Recently, in a pilot study involving COVID-19 patients, NMR spectroscopy was used and showed a reduced number of HDL particles, in particular, a low number of small functional HDL particles [38]. Overall, the HDL profile of COVID-19 patients appears to be quite similar to that of patients with bacterial sepsis with a drastic decrease in HDL-C concentration, changes in HDL proteome and size, and impaired protective effects. These data support the potential of administering functional HDL particles in COVID-19 patients. Several pharmaceutical companies have developed apoA1 nanoparticles reconstituted from recombinant ApoA1 or ApoA1 isolated from human plasma in combination with phospholipids (rHDL). Despite disappointing effects on cardiovascular disease [39–41], these rHDL particles were found to be safe when intravenously injected to patients [42,43] and display antioxidant and anti-inflammatory properties similar to those of plasma-isolated HDLs [44,45]. Recently, intravenous administration of rHDLs in patients with familial lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency, has shown very promising renal and ophthalmologic results [46,47].

Here we present an exploratory multi-omics study of the first intravenous administration of rHDL particles in a severe COVID-19 patient in an intensive care unit (ICU).

## 2. Case Report

### 2.1. Clinical Presentation of the Case Report

A 66-year-old woman with overweight, hypothyroidism, and chronic obstructive pulmonary disease, was hospitalized in ICU for severe COVID-19 requiring high-flow oxygen therapy alternating with noninvasive ventilation on admission. Corticosteroids were administered daily from admission to the ICU for seven days. Because the clinical course was rapidly unfavorable, with, in particular, severe hypoxemia, compassionate administration of recombinant HDL particles (rHDL, CER-001, Abionyx Pharma, Labège, France) was initiated on the first day with a temporary authorization for use (authorization number 58489 from the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products) and after informed consent. Abionyx Pharma did not have access to the data during the treatment period and was not involved in the drafting of the manuscript or the

decision to submit it for publication. rHDLs were injected intravenously every 12 h for 3 consecutive days after ICU admission. EDTA plasma was collected before (H0, H12) and 3 h after rHDL injection (H3 and H15). Additional plasma samples were obtained on Days 4, 5, 6, and 7. Laboratory tests at admission and during the patient's hospitalization in the ICU are described in Table 1. Despite relative stability of the patient's respiratory function during CER-001 treatment with high-flow oxygen therapy and noninvasive ventilation, the patient inexorably deteriorated on day 4, requiring intubation on day 5. The evolution was marked by a severe acute respiratory distress syndrome motivating the administration of a neuromuscular blocking agent and prone positioning without a positive effect on oxygenation. The evolution was unfavorable, and the patient died on Day 7.

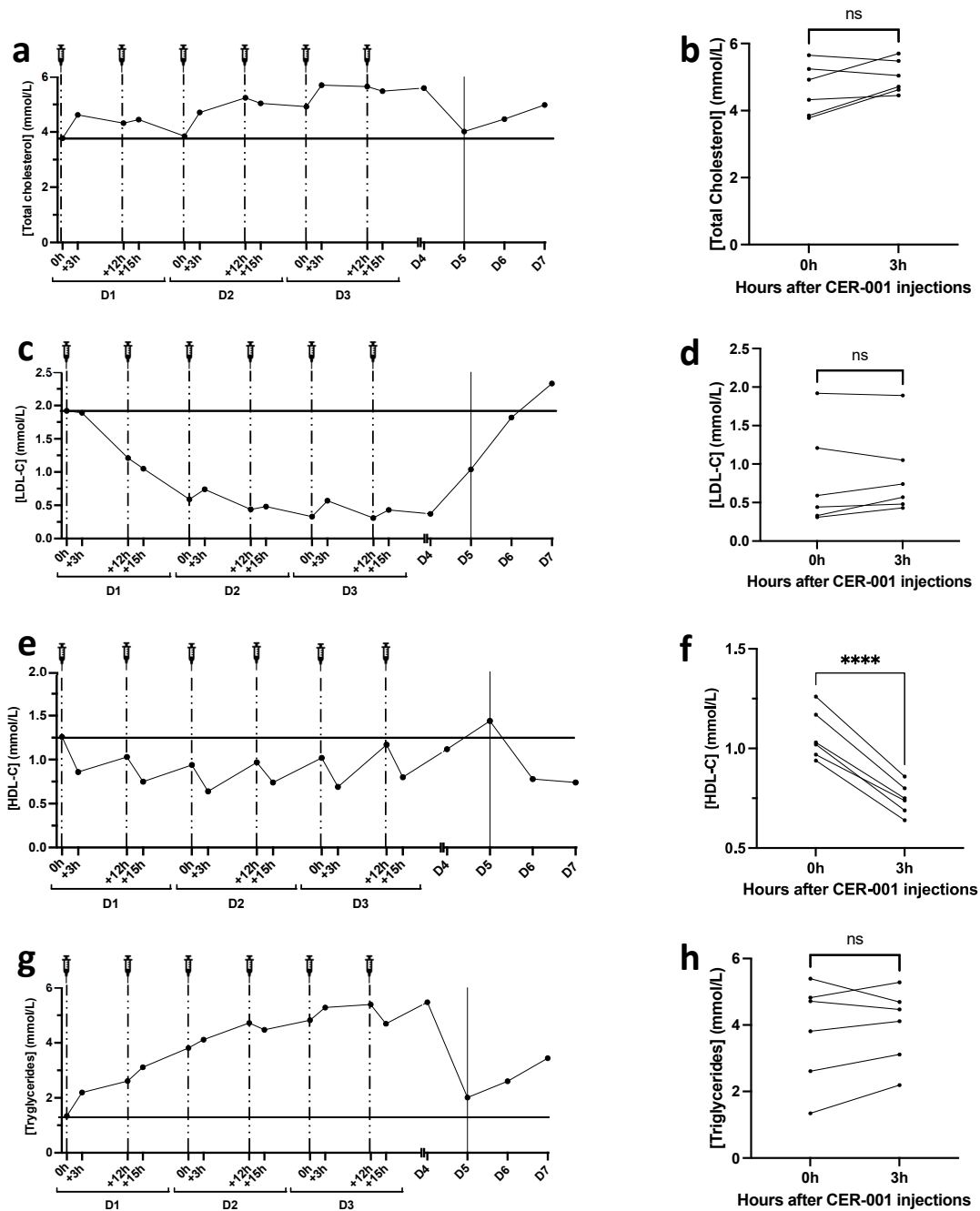
## 2.2. Lipid Profile after rHDL Injections

Different studies have reported that in addition to decreased HDL-C levels, the entire lipid profile is altered in severe COVID-19. Indeed, both total cholesterol, HDL-C, and LDL-C levels are decreased in bacterial sepsis as well as in severe COVID-19. Here, we show that total cholesterol levels were not significantly impacted by CER-001 injections (Figure 1a,b) and that LDL-C levels were low but in the normal range at admission (1.92 mmol/L) and fell to minimal values at D3 (0.33 mmol/L). LDL-C increased slightly after the 3rd to 6th injections of rHDLs and returned to basal concentrations during the patient's worsening phase (from D4 to D7) (Figure 1c), but without a significant impact of rHDL injections (Figure 1d). At admission, HDL-C levels were normal (1.26 mmol/L). Interestingly, HDL-C decreased 3 h after each rHDL injection, suggesting that these particles were functional in terms of reverse cholesterol transport (Figure 1e,f). Noteworthy, the injected rHDL particles (CER-001) do not contain cholesterol and are composed only of phospholipids and ApoA1. Given that HDL-C concentration is determined by quantification of the cholesterol contained in the non-apoB lipoproteins, the reduction in HDL-C levels following rHDL injections may be due to an improved cholesterol transport to the liver and subsequent elimination. Triglyceride levels increased during the hospitalization period and fell after the patient's condition deteriorated (Figure 1g). CER-001 had no significant effect on triglyceride levels 3 h after injection (Figure 1h).

**Table 1.** Laboratory test of the patient during ICU hospitalization.

Laboratory Tests	During CER-001 Treatment												After CER-001 Treatment			
	Day 1				Day 2				Day 3				Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
	H0	H3	H12	H15	H0	H3	H12	H15	H0	H3	H12	H15				
Leukocytes ( $\times 10^9/L$ )	5.41		5.67		9.17		10.47		8.62		10.48		9.88	20.74	19.39	36.64
Neutrophils ( $\times 10^9/L$ )	4.07		4.55		7.08		8.97		6.41		8.76		7.68	18.67	17.01	31.07
Hemoglobin (g/dL)	13.8		13.7		12.7		13.1		11.7		12.6		11.8	11.7	11.4	12.1
Platelets ( $\times 10^9/L$ )	217		250		265		298		212		273		255	173	255	278
Protein (g/L)	75	77	76	71	76	68	73	64	64	66	71	64	65	68	63	64
Creatinine ( $\mu\text{mol/L}$ )	41	43	43	47	43	43	45	44	43	45	40	36	41	49	46	73
AST (U/L)	44	49	46	45	46	54	63	52	54	60	76	63	65	58	34	65
ALT (U/L)	59	62	67	63	67	72	83	74	77	82	112	97	101	108	87	127
Lactates (mmol/L)	0.9	0.9	1		0.9	1	1.2		1	1.3	1.3		1.1	1.1	1.3	3.8
CRP (mg/L)	147	124	110	98	72	70	62	48	33	36	48	54	65	202	315	265
Total cholesterol (mmol/L)	3.78	4.62	4.32	4.45	3.85	4.71	5.24	5.04	4.92	5.70	5.65	5.48	5.59	4.02	4.47	4.98
HDL-C (mmol/L)	1.26	0.86	1.03	0.75	0.94	0.64	0.97	0.74	1.02	0.69	1.17	0.80	1.12	1.44	0.78	0.74
Triglycerides (mmol/L)	1.34	2.19	2.61	3.11	3.81	4.11	4.72	4.47	4.82	5.28	5.39	4.69	5.47	2.01	2.60	3.44
LDL-C (mmol/L)	1.92	1.89	1.21	1.05	0.59	0.74	0.44	0.48	0.33	0.57	0.31	0.43	0.37	1.04	1.82	2.33

ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; CRP: C-reactive protein; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol.



**Figure 1.** Changes in total cholesterol (TC), LDL-C, HDL-C, and triglyceride profiles during CER-001 treatment. TC, LDL-C, HDL-C, and TG were determined using an enzyme kit (CHOL, HDL-C, LDL-C, TRIG methods, Dimension VISTA System, Siemens Healthineers) at all time points, entire methods are exposed in Supplementary File S1. The patient received two injections of CER-001 per day for three days with a 12 h interval between each injection represented by the syringes and dotted lines. On day 5, the patient entered a critical phase represented by a solid line at D5. Plasma was collected in EDTA tubes at different times: 0 h: before CER-001 injection; +3 h: 3 h after the first injection; +12 h: 12 h after the first injection and before the second injection; +15 h: 15 h after the first injection and 3 h after the second injection. (a) Total cholesterol levels during the treatment period before and 3 h after each CER-001 injection (b). (c–f) LDL-C and HDL-C levels during CER-001 treatment. (d,f) Changes in LDL-C and HDL-C 3 h after CER-001 injection. (g,h) Triglyceride levels during CER-001 treatment. A paired *t*-test was performed to compare TC, LDL-C, HDL-C, and triglyceride values between 0 and 3 h after CER-001 injection, \*\*\*\*  $p < 0.0001$  and ns  $p > 0.05$ .



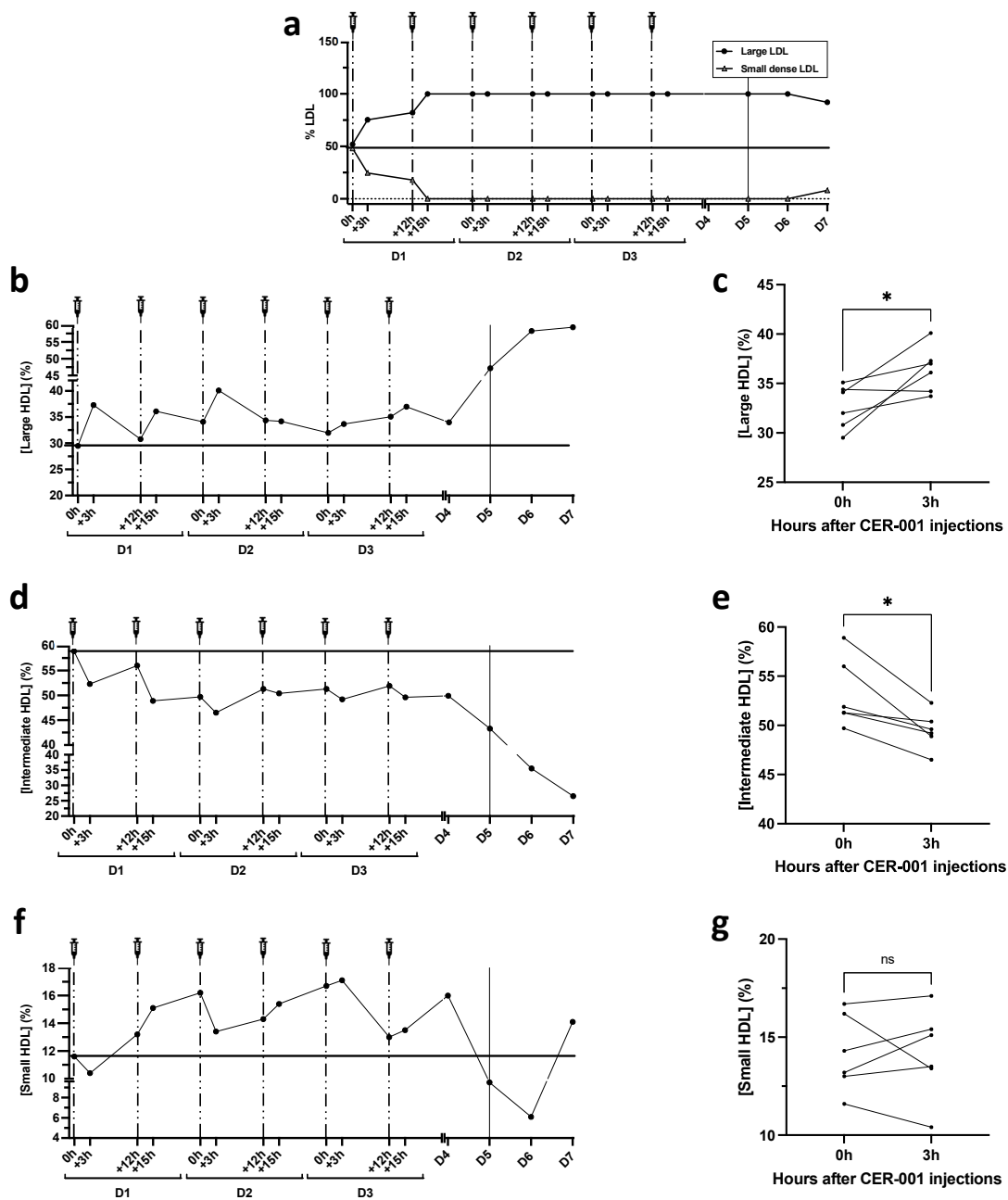
### 2.3. Lipoprotein Particle Size Analysis by Lipoprint

The size of lipoprotein particles is often correlated with their properties and/or functionality. LDL and HDL particle size was assessed by nondenaturing, nonreducing electrophoresis (Lipoprint technique, Quantimetrix, Redondo Beach, CA, USA). The Lipoprint analysis was consistent with the U-shaped curve of LDL-C levels, with a significant decrease, especially of small LDL particles, that was almost undetectable after the first rHDL injections, to rise weakly at the critical phase, outside the period of rHDL injection (D5–7) (Figure 2a). More interestingly, we show an increase in the proportion of large HDL particles 3 h after CER-001 injection, in parallel with a decrease in intermediate-sized particles (Figure 2b–e). This result is expressed as % HDL-cholesterol and reflects the distribution of HDL particles of different sizes containing Sudan black-stainable lipids (native rHDL are poorly stained by this dye). The increase in large HDL particles reflects the ability of injected rHDL to accept and transport cholesterol/cholesterol esters. It is consistent with the decrease in total HDL-C levels observed 3 h after rHDL injection, suggesting their maturation and increased catabolism (hepatic clearance).

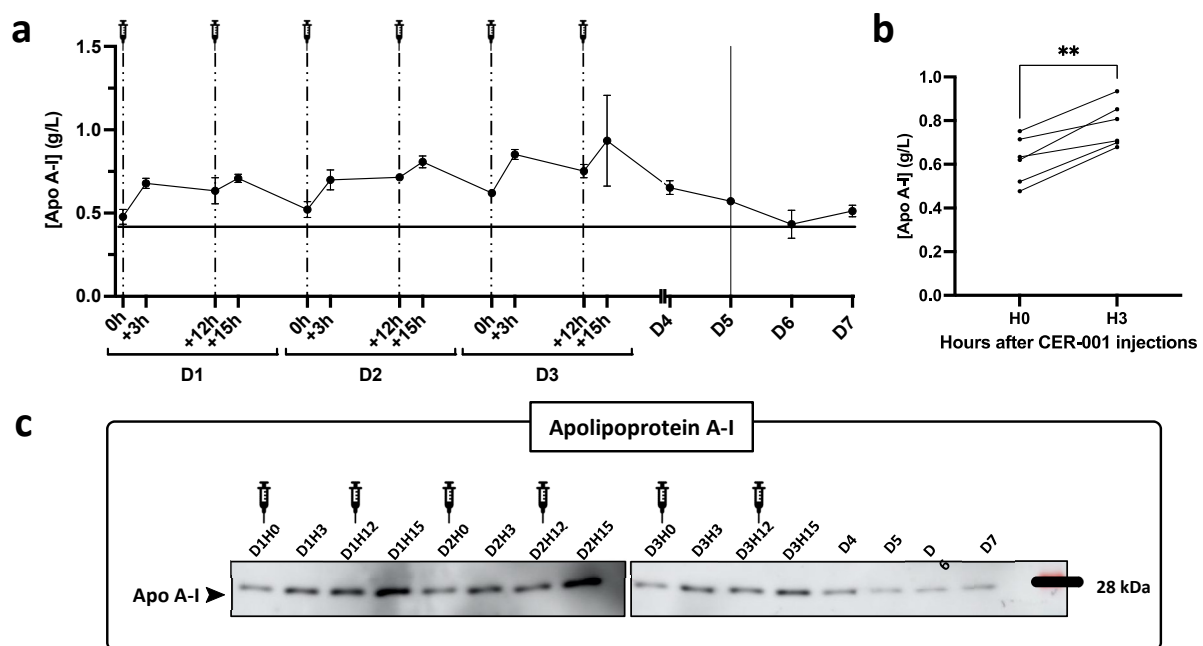
Although non-significantly different after repeated injections of rHDL, the percentage of small HDL particles was slightly increased during the first 3 days and an inverse trend paralleled the worsening of the patient's condition on days 5, 6, and 7 (Figure 2f,g). These results are consistent with previous studies that report that small HDL particles are more antioxidant and anti-inflammatory, whereas large HDL particles are less protective.

### 2.4. Apolipoprotein Concentration in Plasma

Given that rHDLs consist of recombinant apoA1 and phospholipids, we tested for potential changes in the patient's plasma apolipoproteins (including apoA1) that might reflect lipoprotein remodeling during and outside the period of injections. ApoA1 levels were determined by three different techniques: ELISA, Western blot (Figure 3), and mass spectrometry, which also allowed quantification of various other apolipoproteins (Apo(a), ApoA-II, Apo A-IV, Apo B100, Apo(a), Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, Apo E, Apo H, Apo J, Apo M, Apo L1). As expected, plasma apoA1 increased after the different injections to reach a maximum concentration 3 h after the 4th and 5th injections (0.80 and 0.85 g/L). The same trend was observed by ELISA and Western blot, as well as by mass spectrometry. The plasma concentration of apolipoproteins other than ApoA1 did not vary significantly after the rHDL injections.



**Figure 2.** Changes in lipoprotein particle size during CER-001 treatment as determined by Lipoprint analysis. LDL and HDL subclasses were separated from 25  $\mu$ L of plasma by non-denaturing non-reducing electrophoresis according to particle size. (a) Lipoprint analysis of small and large LDL particles. After the first 2 injections of CER-001, small LDL particles were no longer detectable during the rest of the treatment period (100% of large LDL particles). (b–g) Lipoprint analysis of HDL fractions. Kinetics of HDL particle size changes during CER-001 treatment, showing (b) large, (d) intermediate, and (f) small HDL fractions. Comparison before and 3 h after CER-001 injections (c,e,g). A paired *t*-test was performed to compare the percentages of large HDLs, intermediate HDLs, and small HDLs before (0 h) and 3 h after CER-001 injection, \*  $p < 0.0332$  and ns  $p > 0.05$ .

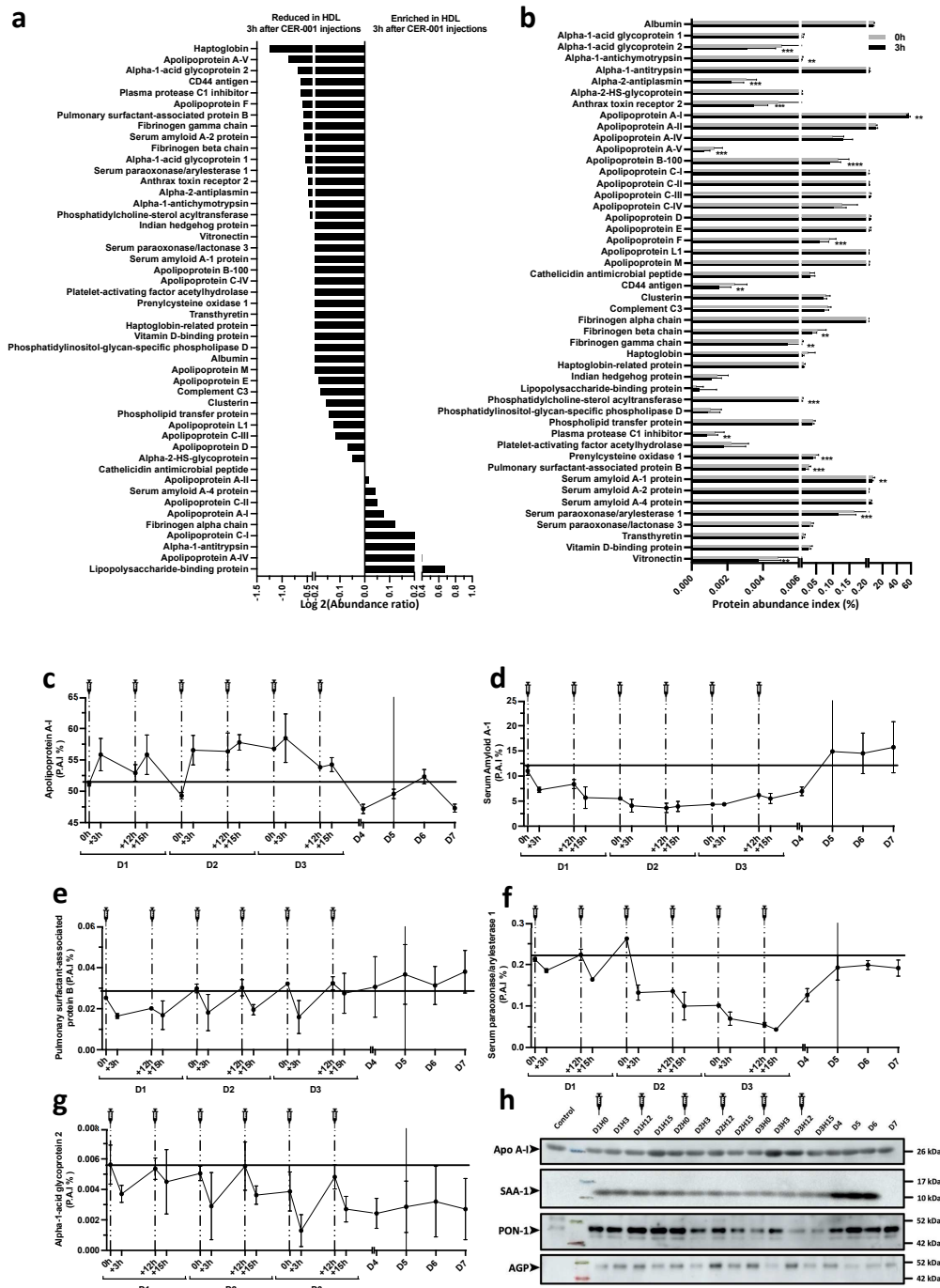


**Figure 3.** Plasma apolipoprotein A-I (Apo A-I) levels following patient treatment with CER-001. Apolipoprotein A-I concentrations were measured in plasma diluted 1:40,000 (Mabtech Inc ELISA kit, 3710-1HP2, Nacka Strand, Sweden) as detailed in Supplementary File S1. The patient received two injections of CER-001 per day over three days with a 12 h interval between each injection represented by the syringes and dashed lines. On day 5, the patient enters a critical phase represented on the graph (a) by a continuous line at D5. Plasma was collected before (0 h, +12 h) and 3 h after (+3 h, +15 h). Apolipoprotein A-I levels were assessed in patient plasma by ELISA (a,b) and Western blot (c). (a) Plasma was diluted 1:40,000. Apolipoprotein A-I concentration is provided in g/L. Each point represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. (b) Comparison of ApoA1 levels before and 3 h after CER-001 injections. \*\*  $p < 0.01$ . (c) Western blot analysis of patient plasma at all time points. Plasma was diluted 1:200 and 8  $\mu$ L were analyzed with an antibody specific for apolipoprotein A-I, to confirm the ELISA results.

### 2.5. Shotgun Proteomics on Isolated HDL Particles Following CER-001 Injections

Whereas total plasma apolipoproteins were not significantly altered, we hypothesized that CER-001 injections may result in changes in the HDL proteome. Shotgun proteomics was performed by LC-MS/MS after trypsin digestion of 5 micrograms of HDLs isolated by ultracentrifugation as described previously [37] and detailed in Supplementary File S1. The results presented in the Figure 4 were generated from the same amount of total protein initially digested before mass spectrometry analysis. Additional normalization was performed by assuming that the total amount of peptides present in each sample was the same. ApoA1 was more abundant in HDLs isolated 3 h after CER-001 injections whereas most of the other differential proteins identified were less abundant (Figure 4a,b). These proteins include Alpha-1 acid glycoprotein 2, Alpha-1 antichymotrypsin, Alpha-2 antiplasmin, Anthrax toxin receptor 2, Apo A-V, Apo B-100, Apo F, CD44 antigen, Fibrinogen alpha and gamma chain, Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase, Plasma protease C1 inhibitor, Prelycysteine oxidase 1, Pulmonary surfactant-associated protein B, Serum paraoxonase/arylesterase 1, and Vitronectin. These results suggest that rHDL supplementation results in the formation of ApoA1-enriched HDLs, whose turnover may be increased, promoting the clearance of proteins associated with normal or pathological HDL particles such as pulmonary surfactant-associated protein B or SAA-1 (Figure 4c–g). As shown in Figure 4h, Western blot analysis globally confirmed the results obtained by mass spectrometry. For instance, SAA-1 was significantly less abundant in HDL particles isolated during the CER-001 treatment period. This hepatic acute phase protein was abundant in

HDLs isolated from the patient at admission, and began to decrease after the 2nd injection, reaching its minimal levels at D2–3, after the 3rd to 5th injections. HDL-SAA increased significantly at D4, 5, 6, and 7, paralleling the deterioration of the patient.

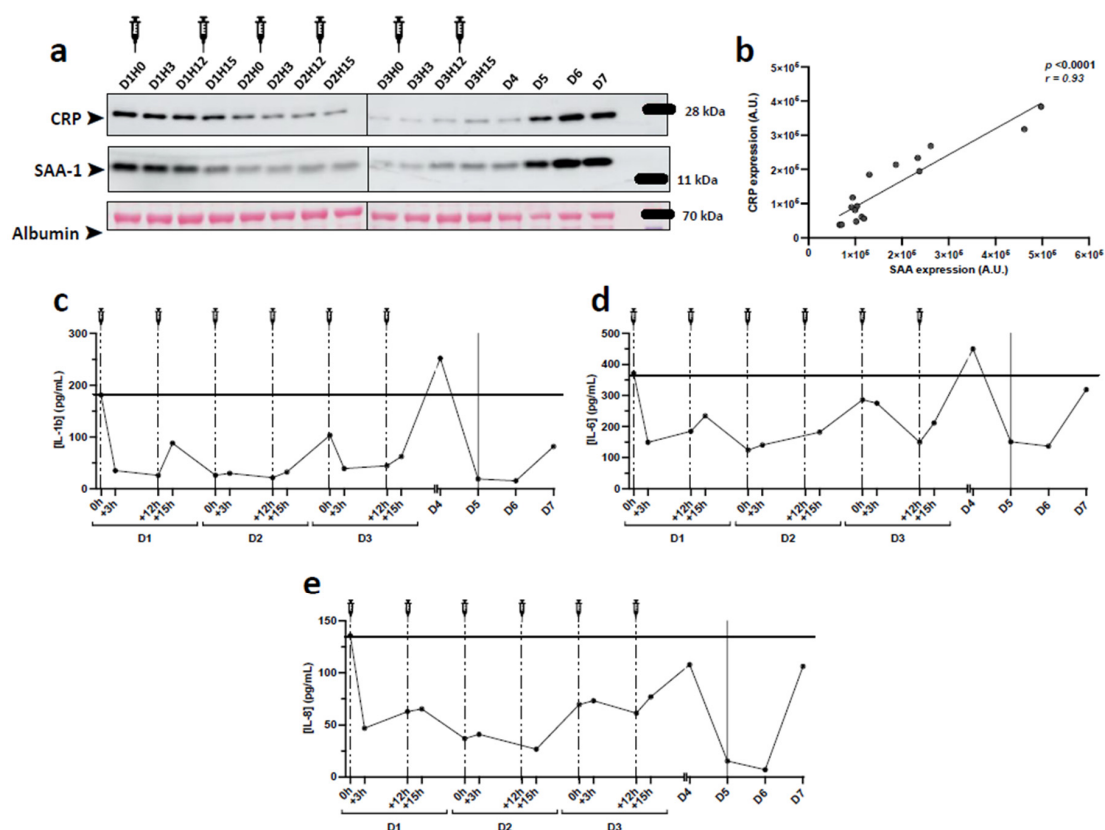


**Figure 4.** Change in HDL protein cargo during CER-001 treatment. The patient’s HDLs were isolated by ultracentrifugation. In total, 5 µg of patient HDL were alkylated, reduced, digested with TPCK-trypsin, and acidified. The digested peptides were then recovered, desalted with Pierce™ peptide desalting spin columns, and dried. Peptides were resuspended in 20 µL of ACN with 0.05% TFA and then analyzed by online nano-LC using an Ultimate 3000 NCS-3500 RS system coupled with a nanospray-ionization mass spectrometer (NSI)-Q-Orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Protein identification and quantification were performed using Proteome discoverer software. The entire method is described in Supplementary File S1. Shotgun analysis by

nano-LC-MS/MS was performed on HDL preparation at all time points. (a) Changes in relative HDL protein abundance at 0 and 3 h after CER-001 injections were expressed as Log<sub>2</sub> (abundance ratio) (3 h/0 h). (b) Variations in HDL protein abundance 3 h after CER-001 injection. Protein abundance is defined as the protein abundance index (P.A.I.) expressed as a percentage. The bars in the graph represent the mean of percent intensity  $\pm$  SD. A multiple paired *t*-test was used with the two-step post hoc method of Benjamini, Krieger, and Yekutieli with FDR set at 1% to adjust the *p*-value. \*\* *p* < 0.0021, \*\*\* *p* < 0.0002, \*\*\*\* *p* < 0.0001 compared with 0 h after CER-001 injection. Percentage change in apolipoprotein A-I (Apo A-I) (c), serum-amyloid A-1 (SAA-1) (d), pulmonary surfactant-associated protein B (e), paraoxonase/arylesterase-1 (PON-1) (f), and alpha-1-acid glycoprotein-2 (AGP-2) (g) during and after CER-001 treatment. (h) Western blot analysis HDL at all time points. A total of 5  $\mu$ g of HDL per lane was transferred and analyzed with specific antibodies for apolipoprotein A-I, SAA-1, PON-1, and acidic alpha-1-glycoprotein (AGP).

## 2.6. Assessment of Plasma Inflammatory Markers Following CER-001 Injections

SAA-1 is an acute phase protein reported to replace ApoA1 and to render HDLs dysfunctional and pro-inflammatory. Given that under inflammatory conditions, SAA-1 is primarily associated with HDLs, we tested whether HDL-SAA-1 could reflect its plasma levels. As shown in Figure 5a by Western blot on plasma samples, SAA-1 showed the same trend as in isolated HDL particles. On admission, SAA-1 levels were elevated and decreased during the rHDL injection period, only to increase again during the deterioration phase. Similarly, C-reactive protein (CRP), which is not associated with HDLs, showed the same trend and its abundance correlated well with that of SAA-1 (Figure 5b). Assessment of inflammatory cytokines and other markers by multiplexed ELISA showed a significant decrease for most of them at D2 before a peak was observed at D4 when the patient's condition deteriorated, especially for IL-6, IL-1beta, and IL-8 (Figure 5c).



**Figure 5.** Markers of inflammation in plasma after CER-001 injections. The levels of IL-1b, IL-6,

and IL-8 were quantified from 1:2 diluted plasma using Luminex xMAP technology. Cytokine concentrations were determined using the Human Custom ProcartaPlex 12-plex kit. The method is detailed in Supplementary File S1. (a) Western blot analysis of acute phase proteins in the patient's plasma. Plasma was diluted 1:40,000, separated to constant volume (8  $\mu$ L), and analyzed with antibodies specific for C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A-1 (SAA-1) after blotting. (b) Positive correlation between CRP and SAA-1 after quantification of Western blots ( $r = 0.93$ ,  $p < 0.0001$ , Pearson correlation). IL-1b (c), IL-6 (d), and IL-8 (e) concentrations were determined by Bioplex from 1:2 diluted plasma.

### 3. Discussion

Beyond the initial phase of viral infection by SARS-CoV-2, the host response is characterized by an inflammatory storm mediated by the release of cytokines and acute phase proteins that participate in potential clinical complications. Numerous molecular targets have been proposed and a plethora of potential therapeutic agents have emerged to combat this post-infection phase that is critical for the clinical outcome of patients [48]. Oxidative stress is also a hallmark of SARS-CoV-2 pathogenesis and antioxidant therapies have, thus, been proposed to alleviate COVID-19 complications [49]. The pleiotropic properties of high-density lipoproteins (HDLs), in addition to their lipid transport function, include anti-inflammatory, antioxidant, anti-thrombotic, and overall endothelial protective effects [50] that may be beneficial in mitigating the inflammatory storm characterizing COVID-19. In addition, as previously reported for bacterial sepsis, HDL-cholesterol levels are markedly decreased in COVID-19 patients and may be related to disease severity [32,33,51]. Supplementation with reconstituted or recombinant HDLs (rHDLs, respectively made with apoA1 isolated from human plasma or by genetic engineering) have shown significant anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo, in preclinical or clinical studies. In humans, several studies have reported the safety of intravenous injections of rHDLs in different clinical settings ranging from diabetes [52,53] and dyslipidemia [54] to atherosclerosis [40]. In the present study, we sought to investigate for the first time the inflammatory and lipoprotein profiles of a patient with severe COVID-19 who received six intravenous injections of rHDLs (CER-001, Abionyx Pharma) in an intensive care unit, benefiting from a temporary authorization for use.

On admission, the lipid profile was normal, with low LDL-C levels, but within the normal range. LDL-C levels decreased significantly during the period of rHDL infusion. In a previous study using the same source of rHDL (CER-001) in familial hypoalphalipoproteinemia (FHA), the authors showed a slight decrease in LDL-C levels 1 h after injection followed by an increase in non-esterified cholesterol and a decrease in esterified cholesterol maintained for 8 h [55]. Here, the decrease in LDL-C cannot be attributed solely to rHDL injections but rather to COVID-19 severity, as reported in several studies [35,56,57]. Furthermore, we show that HDL-C was significantly decreased 3 h after CER-001 injections, whereas ApoA1 concentration was increased. This is not in line with previous studies showing an increase in both HDL-C and ApoA1 after injection of rHDLs (CSL111) in diabetic and FHA subjects (CER-001) [55,58]. Here, it can be hypothesized that there is an increase in the clearance of HDL-C particles, as shown in bacterial sepsis, resulting in a decrease in HDL-C. In addition, the reduced cholesterol efflux capacity could participate in this decrease in HDL-C, as described in endotoxemia [59]. However, in our study, Lipoprint analysis demonstrated an increase in large size HDL particles, suggesting that injected CER-001 may have matured into large HDLs. In mice, injection of rHDLs (CSL-111) induced an increase in HDL particle size with cholesterol enrichment, suggesting remodeling due to increased cholesterol efflux capacity [60]. Enrichment of large HDL particles was reported in bacterial sepsis [21] and a decrease in small, pre-beta HDL particles was observed by NMR in endotoxemia [59].

In the present study, we sought to assess the composition of HDLs after isolation by ultracentrifugation, the standard reference method used to study these lipoproteins. Under inflammatory conditions, including COVID-19, the composition of HDLs is profoundly



altered. We and others have previously shown that SAA (serum-amyloid A)-containing HDLs are dysfunctional and exhibit attenuated endothelial protective effects, particularly under inflammatory conditions, such as COVID-19 [37]. Here, we show that at admission, this acute-phase protein reported to replace ApoA1 in HDLs was highly abundant relative to control HDLs isolated from healthy subjects in which SAA-1 was almost undetectable. HDL-SAA decreased after rHDL injections to minimal levels at D2–3 after the 4th and 5th injections, and then increased significantly again at D4, 5, 6, and 7, reflecting the deterioration of the patient. It is likely that the last injection of rHDLs (D3H12) was not sufficient to bind and eliminate SAA-1, which is abundantly secreted by the liver into the plasma. Except for ApoA1, all other HDL-associated proteins, including those related to inflammation, were decreased after injection of CER-001, suggesting improved clearance of pro-inflammatory HDL particles and potentially a better bioavailability of functional ApoA1 nanoparticles. Indeed, even if after injection, HDL particles are mainly enriched in ApoA1, which alone exerts most of the pleiotropic protective properties attributed to HDLs [50]; this may produce beneficial effects in the context of COVID-19.

In agreement with our previous publication [37], a recent proteomic study reported that HDL cargo was profoundly altered with COVID-19 severity [61], with increased abundance of several proteins such as SAA-1 and -2, SFTPb, ApoF, and inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 while ApoM was more associated with survival in these patients. In the present study, SAA-1, SFTPb, and ApoF were significantly decreased in HDLs 3 h after CER-001 injections. SAA-1 renders HDL pro-inflammatory by replacing ApoA1 and by reducing their cholesterol efflux capacity [62]. SFTPb is a specific marker of the lung proteome, capable of binding HDLs and altering their antioxidant function [63]. Increased clearance of these proteins may be beneficial in COVID-19.

We have previously reported that injection of rHDLs (CSL-111) in three different models of bacterial sepsis in mice reduced inflammation and limited mortality [28]. We also demonstrated that in severe COVID-19, HDLs from patients had reduced anti-inflammatory effects [37]. Here, we tested the overall inflammatory burden reflected in plasma by cytokine production as well as secretion of C-reactive protein and SAA-1 (mainly associated with HDLs). Plasma CRP followed the same trend as SAA-1 and confirmed a correlation between the patient's severity status and acute phase hepatic protein levels.

The multiplexed ELISA analysis performed on inflammatory markers showed a decrease for most of them at D2, but without significant effects 3 h following CER-001 injections. This may be due to the kinetics of production and cellular origin of these cytokines, which does not allow an immediate impact in plasma a few hours after HDL infusions. An increase in IL-6, IL-1beta, and IL-8 was observed at D4 when the patient deteriorated. It appears premature to conclude that the cessation of HDL infusion was the cause of this increase in pro-inflammatory cytokines, also reflected by the increase in CRP and SAA (in plasma and both plasma and HDL for the latter).

About 30% of patients admitted in ICU for severe COVID-19 die despite therapeutics. These therapies combine supportive care (sedation, neuromuscular blockade, mechanical ventilation, catecholamines, renal replacement therapy) and until recently, only steroids have shown efficacy in severe COVID-19 pneumonia. In this case report, several explanations can be given such as an immediately refractory respiratory state on admission to hospital preventing curative action of therapies (corticoids and CER-001) and a respiratory condition weakened by COPD and overweight which is an unfavorable factor in COVID-19. Even if it is difficult to draw any conclusion with this case report, it could have been opportune to continue the CER-001 after day 3 when the patient clinically deteriorated from day 4. Only a randomized, controlled, double-blind study evaluating CER-001 infusion could be helpful in this context.

The limitations of our study are as follows:

- we report only one case of a patient who received an injection of rHDL.
- the decrease in inflammation after rHDL administration cannot be attributed solely to this innovative treatment, due to the lack of statistics.

- Moreover, as recommended, the patient received corticosteroids for 7 days since her arrival in ICU, which may obviously interfere with our results. While corticosteroids were continued, the increase in proinflammatory parameters after stopping rHDL infusion nevertheless raises questions.

In conclusion, our case report shows for the first time that intravenous HDL supplementation is feasible in acute inflammatory conditions such as COVID-19, with a tendency to limit inflammation. HDLs have been shown to reduce mortality in preclinical models of bacterial sepsis via their ability to bind and remove circulating lipopolysaccharides. However, in viral sepsis, less is known about the potential mechanisms by which HDL infusion may be beneficial, particularly by reducing inflammation and via their endothelial protective effects. This case report encourages us to carry out a randomized placebo-controlled trial to evaluate the contribution of rHDL in severe ICU COVID-19 patients.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biomedicines10040754/s1>, Supplementary File S1: methods used in the manuscript. References [37,64,65] are cited in the supplementary materials

**Author Contributions:** T.R., P.T., B.L.-J., D.F., L.d.C., N.Z., E.A. and L.K. participated in the patient inclusion and biochemical analyses with supervision by S.T. and P.M.; F.B. and B.V. performed proteomic and lipid profile analysis including data processing with supervision by O.M.; S.T., P.M., A.T.-D. and O.M. contributed to the conceptualization and design of the study; S.T., F.B., B.V. and O.M. wrote the manuscript, with all authors contributing to its final version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by grants from POE FEDER 2014-20 (TFORCE-COVID and LIPICOR programs, RE20201437 and RE0027601) (EU—Région Réunion—French State national counterpart) and by Université de La Réunion (COVID-19 emergency seed funding).

**Institutional Review Board Statement:** The LIPICOR “LIPid profile changes in Inflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2” study ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT05113836, accessed on 8 February 2022) was approved by the appropriate French ethics committee (Comité de Protection des Personnes SUD-EST IV, ID-RBC: 2020-A02638-31, approved on 7 Decemembr 2020).

**Informed Consent Statement:** The patient was included in the LIPICOR “LIPid profile changes in Inflammatory conditions induced by SARS-CORonavirus-2” study ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) Identifier: NCT05113836, accessed on 8 February 2022). Written informed consent was obtained from the patient. The use of rHDL was accepted by the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (authorization number 58489) and administrated after obtaining informed written consent from the patient.

**Data Availability Statement:** Data sharing not applicable.

**Acknowledgments:** The sponsor of the study was AP-HP (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris). We thank the DRCI (Direction de la Recherche Clinique et de l’Innovation) of the CHU Bichat for its help in obtaining the legal authorizations.

**Conflicts of Interest:** All authors declare no competing interest.

## References

1. Nofer, J.R.; Kehrel, B.; Fobker, M.; Levkau, B.; Assmann, G.; von Eckardstein, A. HDL and arteriosclerosis: Beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **2002**, *161*, 1–16. [[CrossRef](#)]
2. Cooney, M.T.; Dudina, A.; De Bacquer, D.; Wilhelmsen, L.; Sans, S.; Menotti, A.; De Backer, G.; Jousilahti, P.; Keil, U.; Thomsen, T.; et al. HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* **2009**, *206*, 611–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cockerill, G.W.; Rye, K.A.; Gamble, J.R.; Vadas, M.A.; Barter, P.J. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 1987–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Murphy, A.J.; Woollard, K.J.; Hoang, A.; Mukhamedova, N.; Stirzaker, R.A.; McCormick, S.P.A.; Remaley, A.T.; Sviridov, D.; Chin-Dusting, J. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 2071–2077. [[CrossRef](#)]



5. Nofer, J.R.; Levkau, B.; Wolinska, I.; Junker, R.; Fobker, M.; von Eckardstein, A.; Seedorf, U.; Assmann, G. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34480–34485. [[CrossRef](#)]
6. Watson, A.D.; Berliner, J.A.; Hama, S.Y.; La Du, B.N.; Faull, K.F.; Fogelman, A.M.; Navab, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Investig.* **1995**, *96*, 2882–2891. [[CrossRef](#)]
7. Lerch, P.G.; Spycher, M.O.; Doran, J.E. Reconstituted high density lipoprotein (rHDL) modulates platelet activity in vitro and ex vivo. *Thromb. Haemost.* **1998**, *80*, 316–320.
8. Mineo, C.; Shaul, P.W. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: A novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc. Med.* **2003**, *13*, 226–231. [[CrossRef](#)]
9. Ulevitch, R.J.; Johnston, A.R.; Weinstein, D.B. New function for high density lipoproteins. Isolation and characterization of a bacterial lipopolysaccharide-high density lipoprotein complex formed in rabbit plasma. *J. Clin. Investig.* **1981**, *67*, 827–837. [[CrossRef](#)]
10. Wurfel, M.M.; Kunitake, S.T.; Lichenstein, H.; Kane, J.P. Wright SD: Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins acts as a cofactor in the neutralization of, L.P.S. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 1025–1035. [[CrossRef](#)]
11. Vesly, C.J.; Kitchens, R.L.; Wolfbauer, G.; Albers, J.J.; Munford, R.S. Lipopolysaccharide-binding protein and phospholipid transfer protein release lipopolysaccharides from gram-negative bacterial membranes. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 2410–2417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chien, J.Y.; Jerng, J.S.; Yu, C.J.; Yang, P.C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit. Care Med.* **2005**, *33*, 1688–1693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Barlage, S.; Gnewuch, C.; Liebisch, G.; Wolf, Z.; Audebert, F.X.; Gluck, T.; Frohlich, D.; Kramer, B.K.; Rothe, G.; Schmitz, G. Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation. *Intensive Care Med.* **2009**, *35*, 1877–1885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Van Leeuwen, H.J.; Heezius, E.C.; Dallinga, G.M.; van Strijp, J.A.; Verhoef, J.; van Kessel, K.P. Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis. *Crit. Care Med.* **2003**, *31*, 1359–1366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tanaka, S.; Labreuche, J.; Drumez, E.; Harrois, A.; Hamada, S.; Vigué, B.; Couret, D.; Duranteau, J.; Meilhac, O. Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit. *Ann. Intensive Care* **2017**, *7*, 60. [[CrossRef](#)]
16. Tanaka, S.; Stern, J.; Bouzid, D.; Robert, T.; Dehoux, M.; Snauwaert, A.; Zappella, N.; Cournot, M.; Lortat-Jacob, B.; Augustin, P.; et al. Relationship between lipoprotein concentrations and short-term and 1-year mortality in intensive care unit septic patients: Results from the HIGHSEPS study. *Ann. Intensive Care* **2021**, *11*, 11. [[CrossRef](#)]
17. Vaisar, T.; Tang, C.; Babenko, I.; Hutchins, P.; Wimberger, J.; Suffredini, A.F.; Heinecke, J.W. Inflammatory remodeling of the HDL proteome impairs cholesterol efflux capacity. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 1519–1530. [[CrossRef](#)]
18. Sharma, N.K.; Tashima, A.K.; Brunialti, M.K.C.; Ferreira, E.R.; Torquato, R.J.S.; Mortara, R.A.; Machado, F.R.; Assuncao, M.; Rigato, O.; Salomao, R. Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15606. [[CrossRef](#)]
19. Sharma, N.K.; Ferreira, B.L.; Tashima, A.K.; Brunialti, M.K.C.; Torquato, R.J.S.; Bafi, A.; Assuncao, M.; Cesar Pontes Azevedo, L.; Salomao, R. Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clin. Proteom.* **2019**, *16*, 29. [[CrossRef](#)]
20. Guirgis, F.W.; Leeuwenburgh, C.; Grijalva, V.; Bowman, J.; Kalynych, C.; Moldawer, L.; Moore, F.A.; Reddy, S.T. HDL Cholesterol Efflux is Impaired in Older Patients with Early Sepsis: A Subanalysis of a Prospective Pilot Study. *Shock. Augusta Ga* **2017**, *50*, 66. [[CrossRef](#)]
21. Tanaka, S.; Diallo, D.; Delbosc, S.; Genève, C.; Zappella, N.; Yong-Sang, J.; Patche, J.; Harrois, A.; Hamada, S.; Denamur, E.; et al. High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann. Intensive Care* **2019**, *9*, 68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, Z.; Datta, G.; Zhang, Y.; Miller, A.P.; Mochon, P.; Chen, Y.F.; Chatham, J.; Anantharamaiah, G.M.; White, C.R. Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *297*, H866–H873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhang, X.; Wang, L.; Chen, B. Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction. *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 53–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kwon, W.Y.; Suh, G.J.; Kim, K.S.; Kwak, Y.H.; Kim, K. 4F, apolipoprotein AI mimetic peptide, attenuates acute lung injury and improves survival in endotoxemic rats. *J. Trauma. Acute Care Surg.* **2012**, *72*, 1576–1583. [[CrossRef](#)]
25. Guo, L.; Ai, J.; Zheng, Z.; Howatt, D.A.; Daugherty, A.; Huang, B.; Li, X.A. High density lipoprotein protects against polymicrobial-induced sepsis in mice. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17947–17953. [[CrossRef](#)]
26. Datta, G.; Gupta, H.; Zhang, Z.; Mayakonda, P.; Anantharamaiah, G.M.; White, C.R. HDL Mimetic Peptide Administration Improves Left Ventricular Filling and Cardiac output in Lipopolysaccharide-Treated Rats. *J. Clin. Exp. Cardiol.* **2011**, *2*, 1000172. [[CrossRef](#)]
27. Dai, L.; Datta, G.; Zhang, Z.; Gupta, H.; Patel, R.; Honavar, J.; Modi, S.; Wyss, J.M.; Palgunachari, M.; Anantharamaiah, G.M.; et al. The apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F prevents defects in vascular function in endotoxemic rats. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 2695–2705. [[CrossRef](#)]

28. Tanaka, S.; Genève, C.; Zappella, N.; Yong-Sang, J.; Planesse, C.; Louedec, L.; Viranaïcken, W.; Bringart, M.; Montravers, P.; Denamur, E.; et al. Reconstituted High-density Lipoprotein Therapy Improves Survival in Mouse Models of Sepsis. *Anesthesiology* **2020**, *132*, 825–838. [[CrossRef](#)]
29. Tanaka, S.; Couret, D.; Tran-Dinh, A.; Duranteau, J.; Montravers, P.; Schwendeman, A.; Meilhac, O. High-density lipoproteins during sepsis: From bench to bedside. *Crit. Care Lond. Engl.* **2020**, *24*, 134. [[CrossRef](#)]
30. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 727–733. [[CrossRef](#)]
31. Wu, F.; Zhao, S.; Yu, B.; Chen, Y.-M.; Wang, W.; Song, Z.-G.; Hu, Y.; Tao, Z.W.; Tian, J.H.; Pei, Y.Y.; et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **2020**, *579*, 265–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Tanaka, S.; De Tymowski, C.; Assadi, M.; Zappella, N.; Jean-Baptiste, S.; Robert, T.; Peoc'h, K.; Lortat-Jacob, B.; Fontaine, L.; Bouzid, D.; et al. Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0239573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hu, X.; Chen, D.; Wu, L.; He, G.; Ye, W. Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clin. Chim. Acta* **2020**, *510*, 105–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sorokin, A.V.; Karathanasis, S.K.; Yang, Z.-H.; Freeman, L.; Kotani, K.; Remaley, A.T. COVID-19-Associated dyslipidemia: Implications for mechanism of impaired resolution and novel therapeutic approaches. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2020**, *34*, 9843–9853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fan, J.; Wang, H.; Ye, G.; Cao, X.; Xu, X.; Tan, W.; Zhang, Y. Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metabolism* **2020**, *107*, 154243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Yue, J.; Xu, H.; Zhou, Y.; Liu, W.; Han, X.; Mao, Q.; Li, S.; Tam, L.S.; Ma, J.; Liu, W. Dyslipidemia Is Related to Mortality in Critical Patients with Coronavirus Disease 2019: A Retrospective Study. *Front. Endocrinol.* **2021**, *12*, 611526. [[CrossRef](#)]
37. Begue, F.; Tanaka, S.; Mouktadi, Z.; Rondeau, P.; Veeren, B.; Diotel, N.; Tran-Dinh, A.; Robert, T.; Vélia, E.; Mavingui, P.; et al. Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 2291. [[CrossRef](#)]
38. Ballout, R.A.; Kong, H.; Sampson, M.; Otvos, J.D.; Cox, A.L.; Agbor-Enoh, S.; Remaley, A.T. The NIH Lipo-COVID Study: A Pilot NMR Investigation of Lipoprotein Subfractions and Other Metabolites in Patients with Severe COVID-19. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1090. [[CrossRef](#)]
39. Karalis, I.; Jukema, J.W. HDL Mimetics Infusion and Regression of Atherosclerosis: Is It Still Considered a Valid Therapeutic Option? *Curr. Cardiol. Rep.* **2018**, *20*, 66. [[CrossRef](#)]
40. 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.; et al. Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- $\beta$  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 Cardiol.* **2018**, *3*, 815–822. [[CrossRef](#)]
41. Zheng, K.H.; Kaiser, Y.; van Olden, C.C.; Santos, R.D.; Dasseux, J.-L.; Genest, J.; Gaudet, D.; Westerink, J.; Keyserling, C.; Verberne, H.J.; et al. No benefit of HDL mimetic CER-001 on carotid atherosclerosis in patients with genetically determined very low HDL levels. *Atherosclerosis* **2020**, *311*, 13–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Keyserling, C.H.; Barbaras, R.; Benghozi, R.; Dasseux, J.-L. Development of CER-001: Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings. *Clin. Drug Investig.* **2017**, *37*, 483–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gibson, C.M.; Kerneis, M.; Yee, M.K.; Daaboul, Y.; Korjian, S.; Mehr, A.P.; Tricoci, P.; Alexander, J.H.; Kastelein, J.J.P.; Mehran, R.; et al. The CSL112-2001 trial: Safety and tolerability of multiple doses of CSL112 (apolipoprotein A-I [human]), an intravenous formulation of plasma-derived apolipoprotein A-I, among subjects with moderate renal impairment after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* **2019**, *208*, 81–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tardy, C.; Goffinet, M.; Boubekour, N.; Ackermann, R.; Sy, G.; Bluteau, A.; Cholez, G.; Keyserling, C.; Lalwani, N.; Paolini, J.F.; et al. CER-001, a HDL-mimetic, stimulates the reverse lipid transport and atherosclerosis regression in high cholesterol diet-fed LDL-receptor deficient mice. *Atherosclerosis* **2014**, *232*, 110–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Didichenko, S.A.; Navdaev, A.V.; Cukier, A.M.O.; Gille, A.; Schuetz, P.; Spycher, M.O.; Thérond, P.; Chapman, M.J.; Kontush, A.; Wright, S.D. Enhanced HDL Functionality in Small HDL Species Produced Upon Remodeling of HDL by Reconstituted HDL, CSL112: Effects on Cholesterol Efflux, Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 751–763. [[CrossRef](#)]
46. Pavanello, C.; Turri, M.; Strazzella, A.; Tulissi, P.; Pizzolitto, S.; De Maglio, G.; Nappi, R.; Calabresi, L.; Boscutti, G. The HDL mimetic CER-001 remodels plasma lipoproteins and reduces kidney lipid deposits in inherited lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. *J. Intern. Med.* **2021**, *291*, 364–370. [[CrossRef](#)]
47. Faguer, S.; Colombat, M.; Chauveau, D.; Bernadet-Monrozies, P.; Beq, A.; Delas, A.; Soler, V.; Labadens, I.; Huart, A.; Benlian, P.; et al. Administration of the High-Density Lipoprotein Mimetic CER-001 for Inherited Lecithin–Cholesterol Acyltransferase Deficiency. *Ann. Intern. Med.* **2021**, *174*, 1022–1025. [[CrossRef](#)]
48. Farahani, M.; Niknam, Z.; Mohammadi Amirabad, L.; Amiri-Dashatan, N.; Koushki, M.; Nemati, M.; Danesh Pouya, F.; Rezaei-Tavirani, M.; Rasmi, Y.; Tayebi, L. Molecular pathways involved in COVID-19 and potential pathway-based therapeutic targets. *Biomed. Pharm.* **2021**, *145*, 112420. [[CrossRef](#)]
49. Beltrán-García, J.; Osca-Verdegal, R.; Pallardó, F.V.; Ferreres, J.; Rodríguez, M.; Mulet, S.; Sanchis-Gomar, F.; Carbonell, N.; García-Giménez, J.L. Oxidative Stress and Inflammation in COVID-19-Associated Sepsis: The Potential Role of Anti-Oxidant Therapy in Avoiding Disease Progression. *Antioxidants* **2020**, *9*, 936. [[CrossRef](#)]

50. Tran-Dinh, A.; Diallo, D.; Delbosc, S.; Varela-Perez, L.M.; Dang, Q.B.; Lapergue, B.; Burillo, E.; Michel, J.B.; Levoye, A.; Martin-Ventura, J.L.; et al. HDL and endothelial protection. *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *169*, 493–511. [[CrossRef](#)]
51. Masana, L.; Correig, E.; Ibarretxe, D.; Anoro, E.; Arroyo, J.A.; Jericó, C.; Guerrero, C.; la Miret, M.; Näf, S.; Pardo, A.; et al. Low HDL and high triglycerides predict COVID-19 severity. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Drew, B.G.; Duffy, S.J.; Formosa, M.F.; Natoli, A.K.; Henstridge, D.C.; Penfold, S.A.; Thomas, W.G.; Mukhamedova, N.; de Courten, B.; Forbes, J.M.; et al. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **2009**, *119*, 2103–2111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Patel, S.; Drew, B.G.; Nakhla, S.; Duffy, S.J.; Murphy, A.J.; Barter, P.J.; Rye, K.A.; Chin-Dusting, J.; Hoang, A.; Sviridov, D.; et al. Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *53*, 962–971. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Spieker, L.E.; Sudano, I.; Hürlimann, D.; Lerch, P.G.; Lang, M.G.; Binggeli, C.; Corti, R.; Ruschitzka, F.; Lüscher, T.F.; Noll, G. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* **2002**, *105*, 1399–1402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kootte, R.S.; Smits, L.P.; van der Valk, F.M.; Dasseux, J.-L.; Keyserling, C.H.; Barbaras, R.; Paolini, J.F.; Santos, R.D.; van Dijk, T.H.; Dallinga-van Thie, G.M.; et al. Effect of open-label infusion of an apoA-I-containing particle (CER-001) on RCT and artery wall thickness in patients with FHA. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 703–712. [[CrossRef](#)]
56. Wei, X.; Zeng, W.; Su, J.; Wan, H.; Yu, X.; Cao, X.; Tan, W.; Wang, H. Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *J. Clin. Lipidol.* **2020**, *14*, 297–304. [[CrossRef](#)]
57. Aparisi, Á.; Iglesias-Echeverría, C.; Ybarra-Falcón, C.; Cusácovich, I.; Uribarri, A.; García-Gómez, M.; Ladrón, R.; Fuertes, R.; Candela, J.; Tobar, J.; et al. Low-density lipoprotein cholesterol levels are associated with poor clinical outcomes in COVID-19. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **2021**, *31*, 2619–2627. [[CrossRef](#)]
58. Calkin, A.C.; Drew, B.G.; Ono, A.; Duffy, S.J.; Gordon, M.V.; Schoenwaelder, S.M.; Sviridov, D.; Cooper, M.E.; Kingwell, B.A.; Jackson, S.P. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation* **2009**, *120*, 2095–2104. [[CrossRef](#)]
59. de la Llera Moya, M.; McGillicuddy, F.C.; Hinkle, C.C.; Byrne, M.; Joshi, M.R.; Nguyen, V.; Tabita-Martinez, J.; Wolfe, M.L.; Badellino, K.; Pruscino, L.; et al. Inflammation modulates human HDL composition and function in vivo. *Atherosclerosis* **2012**, *222*, 390–394. [[CrossRef](#)]
60. Chen, Z.; O'Neill, E.A.; Meurer, R.D.; Gagen, K.; Luell, S.; Wang, S.-P.; Ichetovkin, M.; Frantz-Wattley, B.; Eveland, S.; Strack, A.M.; et al. Reconstituted HDL elicits marked changes in plasma lipids following single-dose injection in C57Bl/6 mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2012**, *17*, 315–323. [[CrossRef](#)]
61. Souza Junior, D.R.; Silva, A.R.M.; Rosa-Fernandes, L.; Reis, L.R.; Alexandria, G.; Bhosale, S.D.; de Rose Ghilardi, F.; Falcão Dalção, T.; Justi Bertolin, A.; Nicolau, J.C.; et al. HDL proteome remodeling associates with COVID-19 severity. *J. Clin. Lipidol.* **2021**, *15*, 796–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Artl, A.; Marsche, G.; Lestavel, S.; Sattler, W.; Malle, E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 763–772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Banfi, C.; Brioschi, M.; Karjalainen, M.K.; Huusko, J.M.; Gianazza, E.; Agostoni, P. Immature surfactant protein-B impairs the antioxidant capacity of HDL. *Int. J. Cardiol.* **2019**, *285*, 53–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hoefner, D.M.; Hodel, S.D.; O'Brien, J.F.; Branum, E.L.; Sun, D.; Meissner, I.; McConnell, J.P. Development of a Rapid, Quantitative Method for LDL Subfractionation with Use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin. Chem* **2001**, *47*, 266–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Blanchard, V.; Garçon, D.; Jaunet, C.; Chemello, K.; Billon-Crossouard, S.; Aguesse, A.; Garfa, A.; Famchon, G.; Torres, A.; Le May, C.; et al. A High-Throughput Mass Spectrometry-Based Assay for Large-Scale Profiling of Circulating Human Apolipoproteins. *J. Lipid Res* **2020**, *61*, 1128–1139. [[CrossRef](#)]





## C. Discussion et perspectives

Au cours de cette étude clinique, nous avons montré que la perfusion du CER-001 au cours d'un sepsis viral COVID-19 présentait des effets bénéfiques sur certains paramètres inflammatoires. Les injections de CER-001 ont induit une diminution des concentrations de HDL-C et une augmentation des concentrations en Apo A-I, trois heures après chaque injection. De plus, nous constatons une augmentation globale des concentrations de HDL-C et d'Apo A-I, au fur et à mesure du traitement. La diminution des concentrations en HDL-C trois heures post-injections laisse supposer une augmentation de la clairance des particules de HDL endogènes chargées en cholestérol alors que les CER-001 qui sont formés à partir d'un mélange de sphingomyéline et de dipalmitoyl phosphoglycérol et ne contiennent pas de cholestérol (Tardy et al. 2014). Nous avons aussi montré la formation progressive de grosses HDL et la diminution de petites HDL durant le traitement. Cette observation avait également été faite sur différents modèles murins de sepsis ayant reçu des injections de CSL-111 (Tanaka et al. 2020a). Nous avons également montré une diminution de l'inflammation durant le traitement, accompagnée d'une diminution des cytokines pro-inflammatoires et des protéines de la phase aiguë comme la CRP, AGP-1 et la SAA et par un enrichissement en médiateurs anti-inflammatoires comme l'Apo A-I et la PON1. Les changements obtenus concernant la composition protéique des HDL de la patiente laissent penser à une inhibition de la dysfonction de ces nanoparticules durant la COVID-19. Cependant, notre étude présente une limite notable qui est de tirer des conclusions sur la base de résultats obtenus sur une unique patiente. Il serait pertinent de réaliser l'infusion de CER-001 en addition des thérapies de la COVID-19, pour confirmer nos observations.

Dans la première étude où il était utilisé, le CER-001 a montré des effets anti-inflammatoires sur des HUVEC activées par du LPS. *In vivo* chez la souris, son administration a induit une diminution de la concentration en HDL-C et était associée à une augmentation de l'efflux du cholestérol dans le plasma (Tardy et al. 2014). Ces résultats confortent les observations faites chez la patiente ayant reçu les perfusions de CER-001 en plus des corticostéroïdes utilisés en thérapie contre la COVID-19.

La dose perfusée au cours de notre étude était de 10 mg/kg de CER-001 avec une perfusion de CER-001 toutes les 12h et sur 3 jours. Actuellement, la pharmacocinétique du CER-001 qui a été réalisée uniquement chez des sujets sains a montré une tolérance pour une dose de 45 mg/kg (Keyserling et al. 2017). Aucune étude pharmacocinétique et de tolérance au CER-001 n'avait été réalisée sur des patients en situation de sepsis. Une option serait de déterminer la dose maximale à perfuser à des patients en situation de sepsis bactérien ou viral, en fonction de leur situation clinique car dans notre étude la dose a été uniquement de 10 mg/kg de CER-001.

Une étude publiée quelques mois après la nôtre, a évalué la perfusion de CER-001 chez quatre patients atteints d'une forme grave de la COVID-19 en utilisant la même dose que nous, c'est-à-dire 10 mg/kg. Ils ont montré une amélioration des fonctions respiratoires des patients dès le début de la thérapie et ils ont aussi observé une diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-8) durant le traitement (Faguer et al. 2022). Les résultats de cette étude vont dans le même sens que ceux obtenus chez notre patiente.

Au vu des résultats bénéfiques obtenus après les injections de CER-001 pour traiter la COVID-19, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité de ce traitement pour d'autres états d'hyper-inflammation, virale ou bactérienne.

Au cours d'une infection par le virus de la dengue, les concentrations en Apo A-I et en HDL-C chutent également drastiquement comme au cours de la COVID-19 alors que l'Apo A-I montre des effets antiviraux et anti-inflammatoires contre la dengue (Coelho et al. 2021). La dengue est une infection virale causée par le virus de la dengue, transmise par le moustique, elle est répandue dans les régions tropicales et subtropicales. La Réunion et la moitié du monde sont touchées par ces épidémies de dengue, pour laquelle aucune thérapie n'existe actuellement, mise à part deux vaccins, DENVAXIA et Qdenga, dont l'efficacité reste à prouver. Par conséquent, l'évaluation d'une thérapie reposant sur la perfusion de HDL mimétiques au cours de la dengue est à envisager afin de limiter ses formes graves. Au cours de l'étude de Coelho et al., les auteurs ont aussi montré que l'effet antiviral de l'Apo A-I était porté par l'un de ses peptides, le peptide 4F (Coelho et al. 2021). L'utilisation d'un peptide de l'Apo A-I pourrait être aussi efficace que l'Apo A-I entière. L'utilisation de ces peptides mimétiques est très attractive notamment en raison de leur faible coût, leur facilité de production, de contrôle qualité et de sécurité. Le développement de HDL mimétiques à partir de ces peptides est une voie qui est déjà développée avec l'ETC-642.



Le CER-001 a toutefois déjà été testé récemment chez des patients en situation de sepsis bactérien et sur un modèle *in vivo* de souris sepsis comme nous l'avons mentionné dans la synthèse bibliographique. Le CER-001 a montré des effets anti-inflammatoires, anti-infectieux et vasculo-protecteurs dans des modèles *in vitro*, *in vivo* et sur des patients atteints de sepsis dû à une infection par une bactérie Gram négatives. Dans les modèles *in vivo*, le CER-001 favorise l'excrétion du LPS dans la bile et améliore leur survie. Chez l'Homme, les injections de CER-001 a diminué la tempête cytokinique, l'endotoxémie et la dysfonction endothéliale. L'injection de CER-001 a amélioré la survie des patients souffrants de sepsis, sans altérer les fonctions rénales et hépatiques (Stasi et al. 2023). Dans notre étude, il serait pertinent d'évaluer les effets des CER-001 en situation d'infection par le SARS-CoV-2 dans un modèle de hamster. Cette étude *in vivo*, permettrait de compléter nos observations obtenues sur notre étude sur l'unique patiente ayant reçu une thérapie de CER-001. En effet, l'étude des injections de CER-001 ou par d'autres voies d'administration dans un modèle *in vivo* permettra d'apprécier la biodistribution, d'évaluer les effets anti-inflammatoires et éventuellement antiviraux des CER-001 durant une infection par le SARS-CoV-2.

L'utilisation du CER-001 au cours des infections a été lancée nouvellement. Il serait pertinent d'évaluer l'efficacité du CSL-112 au cours des septicémies. En effet, son prédécesseur, le CSL-111 a déjà montré des effets bénéfiques au cours du sepsis en modèle préclinique (Tanaka et al. 2020a) et chez l'Homme (Pajkrt et al. 1996). Aucune étude ne porte sur l'utilisation des CSL-112, au cours d'un sepsis tant bactérien que viral. L'évaluation de l'efficacité anti-inflammatoire et anti-infectieuse des CSL-112, contribuerait à l'ajout d'une nouvelle thérapie reposant sur les HDL mimétiques au cours d'un sepsis.

Nous avons montré au cours de nos précédentes études, une diminution des concentrations en PON1 sur les HDL en situation inflammatoire. Il serait pertinent d'optimiser les HDL mimétiques en les enrichissant en PON1 afin de les administrer pour pallier leur déficience pendant la maladie. L'utilisation de HDL en tant que vecteur thérapeutique est déjà établie et a déjà été réalisée dans différentes études (Ben-Aicha et al. 2020).



Pour conclure, notre dernière étude a montré l'intérêt manifeste d'une thérapie reposant sur l'injection de HDL mimétiques au cours d'un sepsis viral. Nous avons montré une diminution globale de l'état inflammatoire de la patiente incluse dans l'étude. Cependant, l'interprétation des résultats et les conclusions qu'on en tire peuvent être sujets à caution dans la mesure où notre étude ne compte qu'une seule patiente. Il serait donc pertinent de renouveler une analyse sur plus de patients en situation de sepsis viral.





**CONCLUSION GÉNÉRALE**  
**&**  
**PERSPECTIVES**

Les travaux de recherche de ma thèse apportent de nouveaux éléments de compréhension des perturbations du métabolisme des lipoprotéines pouvant apparaître lors d'une infection virale.

Au cours de la première partie de mon travail, j'ai pu évaluer l'impact de l'infection virale sur le métabolisme des lipoprotéines et recherché des marqueurs associés à la sévérité de l'infection. Dans cette étude, j'ai mesuré les différentes concentrations d'apolipoprotéines et mis en évidence une importante perturbation dans le métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides pouvant expliquer l'augmentation des triglycérides durant la COVID-19 (**Figure 37**). J'ai aussi démontré une altération possible au niveau de la maturation des HDL, justifiant possiblement les concentrations basses en HDL-C. J'ai également mesuré des apolipoprotéines présentant des fonctions autres et non impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines telles que les Apo J, M, H (**Figure 37**). Ces différentes apolipoprotéines sont diminuées lors de l'infection, suggérant une implication dans les altérations endothéliales observées au cours de la COVID-19 comme la perméabilité vasculaire et les différentes thromboses contribuant aux dysfonctions des organes (**Teuwen et al. 2020; Martínez-Salazar et al. 2022**). De plus, j'ai démontré que les Apo H, J et M se retrouvent diminuées significativement chez les patients non survivants. Ces observations suggèrent qu'il est envisageable de concevoir un outil de prédiction du devenir du patient fondé sur les concentrations de ces apolipoprotéines dans le plasma. Cependant, le développement de ce test pronostique nécessiterait la mise en place d'une étude multicentrique, avec la collecte de plasma provenant de patients atteints de la COVID-19 et présentant des signes cliniques allant de symptômes bénins à la grippe sévère, en passant par les pneumonies aiguës et allant jusqu'à la mort. Cette étude permettrait d'évaluer les concentrations plasmatiques des différentes apolipoprotéines, afin de confirmer leur valeur pronostique et adapté le traitement et la prise en charge des patients.

Dans le but de parvenir à une bonne compréhension du métabolisme des lipoprotéines en situation d'infection virale, il serait pertinent de compléter les mesures de concentration d'enzymes impliquées dans le métabolisme comme la CETP, la LPL, l'HL et la PLTP. À ce jour, nous envisageons de doser les peptides signatures de la CETP et de la PLTP en spectrométrie de masse (**Figure 37**). Et parallèlement il serait également pertinent de mesurer l'activité de ces différentes enzymes directement dans le plasma des patients.

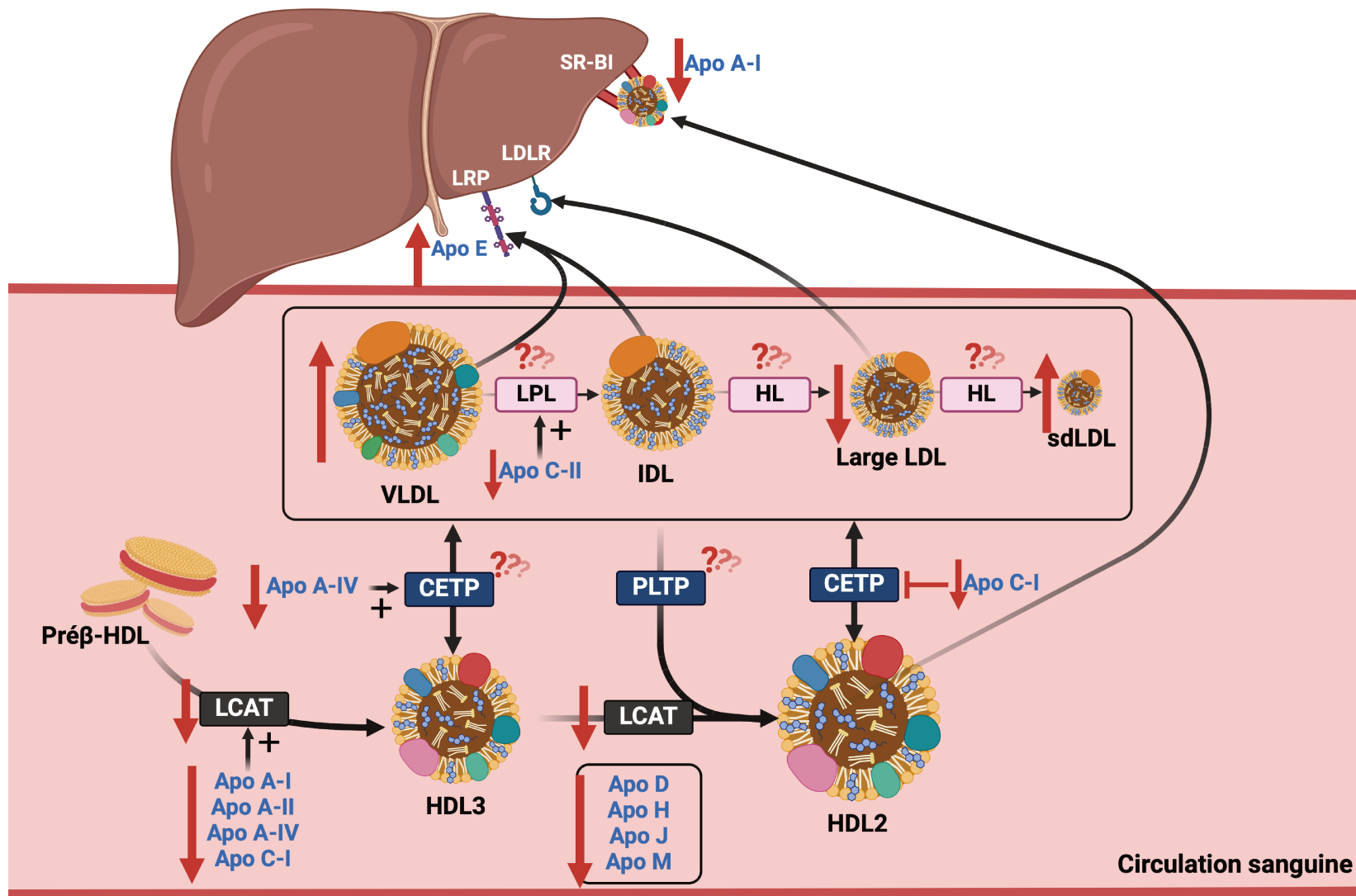
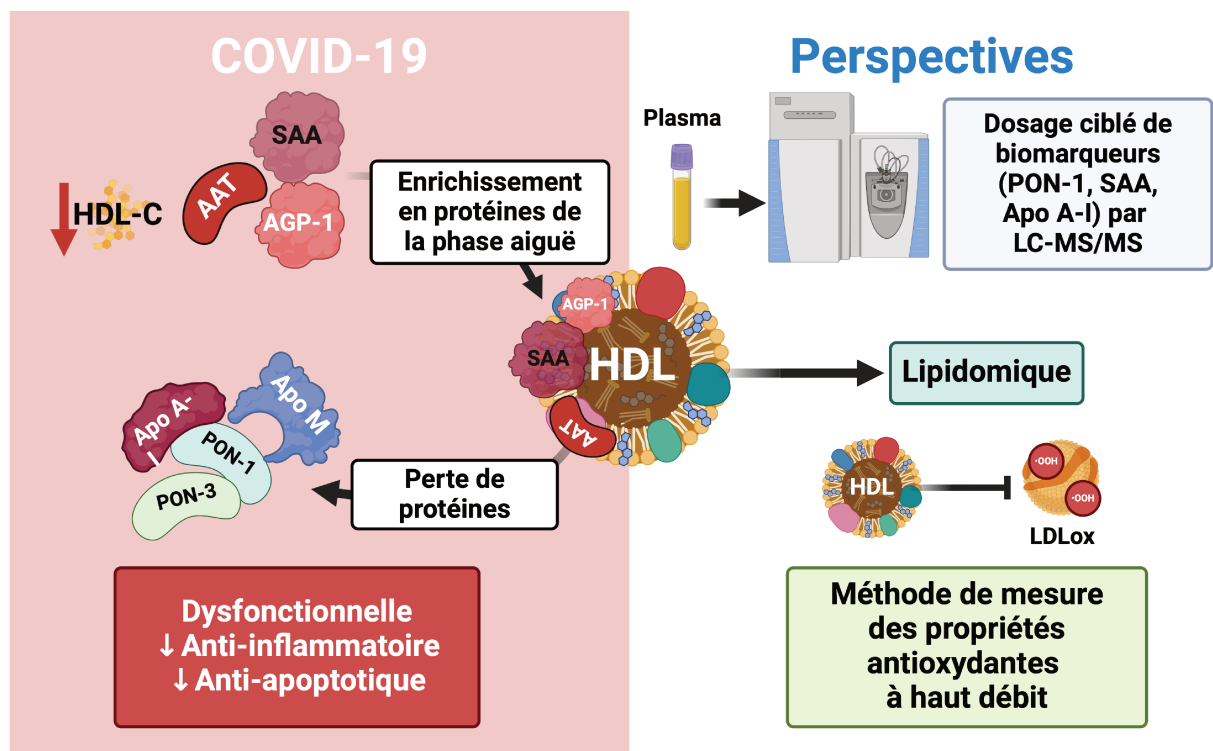


Figure 37. Altération des concentrations circulantes des apolipoprotéines et de la LCAT : implication possible sur le métabolisme lipidique

Jusqu'à présent, la caractérisation des lipoprotéines a été principalement réalisée dans le cadre des maladies diabétiques et cardiovasculaires. L'importance de la mesure de la qualité des lipoprotéines est grandissante dans différentes pathologies, justifiant l'exploration de la caractérisation structurale et fonctionnelle de celles-ci. Peu d'études ont été menées sur la caractérisation des lipoprotéines en situation de sepsis bactérien et encore moins lorsqu'il est d'origine virale. La seconde partie de mon travail de thèse apporte de nouveaux éléments sur la caractérisation compositionnelle, structurale et fonctionnelle des lipoprotéines en situation d'infection virale. J'ai pu montrer un enrichissement en protéines de la phase aiguë (SAA, AAT, AGP-1) dans les HDL au cours de la COVID-19 et parallèlement une perte de nombreuses apolipoprotéines dont l'Apo A-I, l'Apo M mais aussi d'enzymes antioxydantes comme les paraoxonases 1 et 3 (**Figure 38**). La modification de la composition protéique de ces HDL peut être à l'origine d'une perte des fonctions anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. En raison de la perte des enzymes antioxydantes, nous émettons l'hypothèse que les HDL ont aussi perdu cette fonction. La mise en place d'un test mesurant la capacité antioxydante des HDL en plaque 96 puits pour un criblage à haut débit est actuellement en cours.

Lors de mon travail, j'ai aussi mis en évidence une perturbation dans la distribution des sous-populations de lipoprotéines pouvant apparaître au cours de la COVID-19. Les patients présentent en effet un profil lipoprotéique athérogène avec des concentrations élevées en LDL petites et denses et en VLDL, et des concentrations basses en grosses LDL et en HDL. Une étude publiée récemment réalisée sur des patients COVID-19 et utilisant la RMN pour l'analyse du profil des sous-populations de lipoprotéines, a montré des résultats similaires aux nôtres obtenus par la technique d'électrophorèse en tube sur gel de polyacrylamide Lipoprint (**Ballout et al. 2021**). La RMN constitue une méthode d'analyse plus avancée et plus précise pour étudier les lipoprotéines et leurs sous-populations. Il apparaît donc pertinent de conforter nos résultats en réalisant l'analyse des différentes lipoprotéines par RMN, afin de mesurer l'ensemble des sous-populations de lipoprotéines, ainsi que leurs concentrations en phospholipides, triglycérides et cholestérol.



**Figure 38. Modifications des HDL en situation de COVID-19, perspectives sur les méthodes de dosages et d'analyse des fonctionnalités des HDL**

Au cours de ces dernières décennies, l'étude quantitative des HDL par la mesure des concentrations en HDL-C a montré ses limites. Les résultats négatifs des essais cliniques, visant à augmenter les concentrations en HDL-C par voie médicamenteuse, mettent en évidence l'importance de la qualité de ces nanoparticules plutôt que leur quantité. En effet, malgré l'augmentation des concentrations en HDL-C observée dans les essais cliniques, aucun effet n'a été rapporté quant à une quelconque incidence positive sur les maladies cardiovasculaires. La qualité de ces nanoparticules joue très probablement un rôle très important. Bien que l'augmentation par voie médicamenteuse des HDL au cours d'une infection n'ait jamais été testée, elle reste une piste prometteuse.

Une nouvelle thérapie reposant sur l'injection d'HDL mimétiques fonctionnelles afin de renouveler le pool de HDL natives potentiellement dysfonctionnelles est donc une piste à développer. En raison de l'ensemble des modifications citées précédemment, l'utilisation de cette nouvelle thérapie est envisageable en situation de sepsis. D'autant plus qu'à ce jour, il n'existe aucun traitement approuvé pour les patients en situation de sepsis dans le monde. Dans la troisième partie de ma thèse, nous avons ouvert la voie à l'utilisation de la thérapie reposant sur la perfusion de HDL recombinantes, les CER-001, chez les patients en situation de sepsis viral. Nous avons pu montrer chez une patiente atteinte d'une forme grave de COVID-19, une diminution significative de l'inflammation consécutive à l'injection de CER-001



(Figure 39). En complément des analyses des échantillons sanguins provenant de cette patiente traitée, il serait pertinent de réaliser des expériences sur un modèle *in vitro* d'infection de la SARS-CoV-2. Les analyses par exemple, sur des modèles *in vitro* de cultures de cellules infectées par le virus et traitées par des HDL permettraient de comprendre le mécanisme cellulaire sous-jacent permettant aux lipoprotéines de réduire l'inflammation. Les résultats de telles études permettraient de conforter l'idée de l'utilisation d'injections de HDL mimétiques en situation de sepsis viral ou bactérien comme nouvelle thérapie prometteuse pour lutter contre le sepsis.

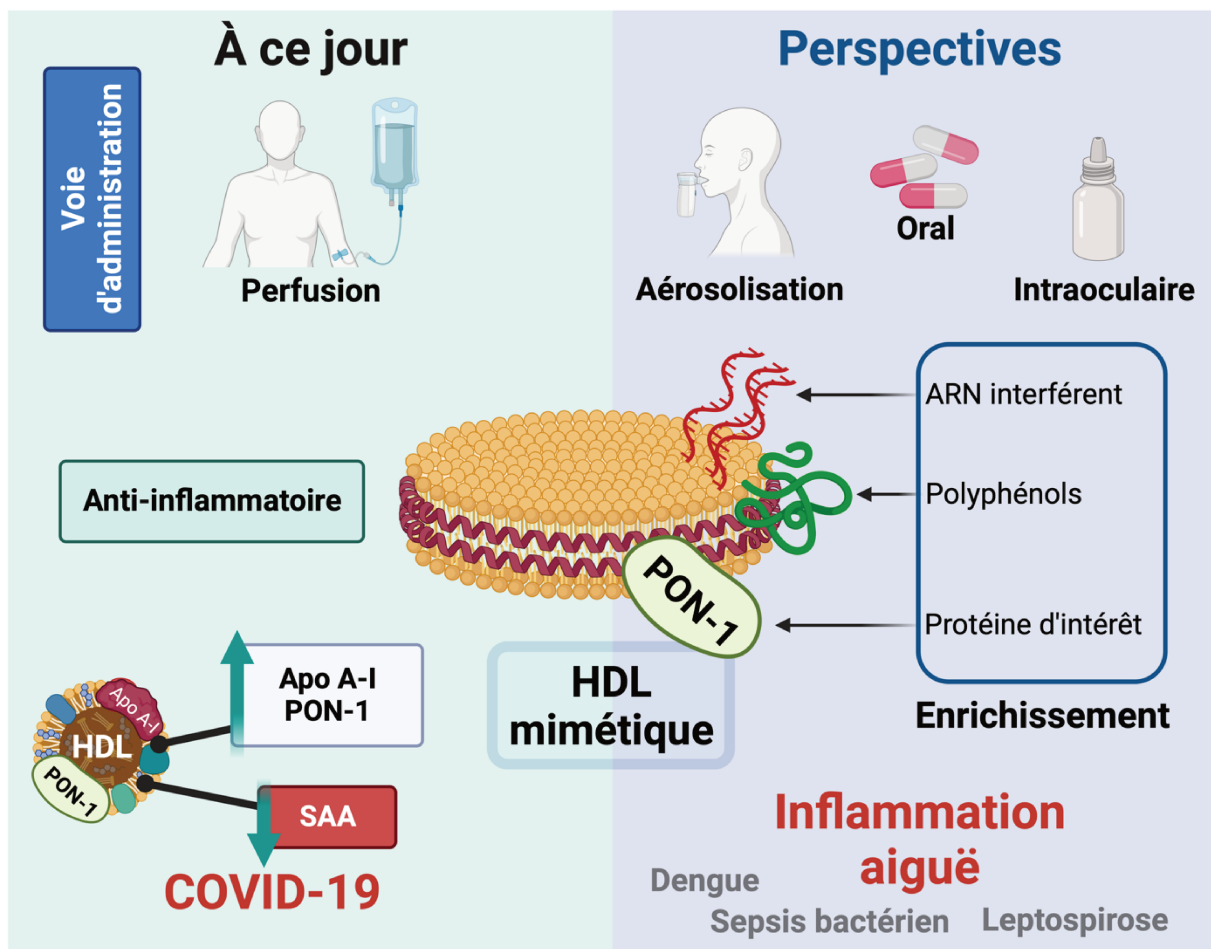


Figure 39. Thérapie par HDL mimétiques dans le contexte de la COVID-19 et perspectives d'enrichissement et diverses voies d'administration des HDL mimétiques dans différentes infections.

Au-delà des expériences complémentaires proposées précédemment, ce travail ouvre de nouvelles perspectives de développement d'outils pronostics et thérapeutique :

Tout au long de ma thèse, je me suis focalisé sur l'analyse des lipoprotéines de haute densité pendant la COVID-19. Cependant, la caractérisation des HDL est longue, à cause de la difficulté de l'isolement des lipoprotéines par ultracentrifugation. Le développement d'outils permettant de connaître la fonctionnalité des HDL uniquement par le dosage de marqueur de fonctionnalité serait une piste à développer. Parmi les protéines à doser permettant de prédire la fonctionnalité de ces nanoparticules figurent les concentrations en Apo A-I, en SAA ou encore PON1. Nous avons pu commencer la mise en place du dosage de la SAA directement à partir de plasma par une méthode ciblée par spectrométrie de masse.

Concernant la partie thérapeutique, la stratégie thérapeutique basée sur la supplémentation en HDL nécessite encore des perfectionnements, notamment concernant la voie d'administration. En effet, les injections d'HDL mimétiques restent encore trop invasives. Aussi, il serait pertinent de développer des HDL mimétiques administrable par voie orale, par voie intraoculaire ou par aérosolisation dans le contexte d'une thérapie contre une inflammation aiguë localisée (**Figure 39**). Notre laboratoire a d'ailleurs développé une technique d'aérosolisation des HDL permettant ainsi de les administrer directement dans les poumons, une zone cible pour la COVID-19.

Aussi, les HDL mimétiques transportent principalement de l'Apo A-I. Au-delà de l'utilisation de peptides d'Apo A-I, les HDL peuvent être utilisées comme vecteurs de molécules anti-inflammatoires, antioxydantes voire anti-infectieuses. Les HDL mimétiques peuvent ainsi être enrichies en protéines retrouvées diminuées dans les HDL natives lors de la maladie. Elles peuvent aussi être enrichies en miR ou ARN interférent permettant de lutter contre l'infection en inhibant la réplication virale (**Figure 39**).

Enfin, cette démarche de caractérisation des lipoprotéines et de supplémentation en HDL mimétiques mériterait d'être étendue à d'autres pathologies infectieuses associées à une diminution des concentrations de HDL-C et LDL-C comme la leptospirose, la dengue ou encore le sepsis bactérien (**Figure 39**).



# **RÉFÉRENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



# A

- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al (1996) Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* 271:518–520. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.518>
- Adiels M, Borén J, Caslake MJ, et al (2005) Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1697–1703. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000172689.53992.25>
- Adiels M, Olofsson S-O, Taskinen M-R, Borén J (2008) Overproduction of Very Low-Density Lipoproteins Is the Hallmark of the Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28:1225–1236. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.160192>
- Aharoni S, Aviram M, Fuhrman B (2013) Paraoxonase 1 (PON1) reduces macrophage inflammatory responses. *Atherosclerosis* 228:353–361. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.03.005>
- Ahnström J, Faber K, Axler O, Dahlbäck B (2007) Hydrophobic ligand binding properties of the human lipocalin apolipoprotein M. *Journal of Lipid Research* 48:1754–1762. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700103-JLR200>
- Alaupovic P (1971) Apolipoproteins and lipoproteins. *Atherosclerosis* 13:141–146. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(71\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0021-9150(71)90018-9)
- Alaupovic P (1996) [2] Significance of apolipoproteins for structure, function, and classification of plasma lipoproteins. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 32–60
- Alaupovic P (2003) The concept of apolipoprotein-defined lipoprotein families and its clinical significance. *Curr Atheroscler Rep* 5:459–467. <https://doi.org/10.1007/s11883-003-0036-8>
- Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ (1972) Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 260:689–707. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(72\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(72)90018-5)
- Al-Omari M, Korenbaum E, Ballmaier M, et al (2011) Acute-Phase Protein  $\alpha$ 1-Antitrypsin Inhibits Neutrophil Calpain I and Induces Random Migration. *Mol Med* 17:865–874. <https://doi.org/10.2119/molmed.2011.00089>
- Altmann SW, Davis HR, Zhu L-J, et al (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303:1201–1204. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>
- Amar MJA, D'Souza W, Turner S, et al (2010) 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 334:634–641. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.167890>
- American Diabetes Association (2017) Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* 41:S13–S27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- Anderson DW, Nichols AV, Pan SS, Lindgren FT (1978) High density lipoprotein distribution. *Atherosclerosis* 29:161–179. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(78\)90005-9](https://doi.org/10.1016/0021-9150(78)90005-9)

Apostolou F, Gazi IF, Lagos K, et al (2010) Acute infection with Epstein–Barr virus is associated with atherogenic lipid changes. *Atherosclerosis* 212:607–613. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.006>

Astorga J, Gasaly N, Dubois-Camacho K, et al (2022) The role of cholesterol and mitochondrial bioenergetics in activation of the inflammasome in IBD. *Frontiers in Immunology* 13:

Asztalos BF, Schaefer EJ (2003) HDL in atherosclerosis: actor or bystander? *Atherosclerosis Supplements* 4:21–29. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(03)00006-0)

Asztalos BF, Sloop CH, Wong L, Roheim PS (1993) Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: Recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1169:291–300. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90253-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90253-6)

Atehortua L, Morris J, Street SE, et al (2023) Apolipoprotein E-containing HDL decreases caspase-dependent apoptosis of memory regulatory T lymphocytes. *J Lipid Res* 64:100425. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100425>

Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM (1990) Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 82:495–506. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.2.495>

Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, et al (1998) Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 101:1581–1590

## B

Badimon JJ, Badimon L, Fuster V (1990) Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest* 85:1234–1241. <https://doi.org/10.1172/JCI114558>

Bai X, Schountz T, Buckle AM, et al (2023) Alpha-1-antitrypsin antagonizes COVID-19: a review of the epidemiology, molecular mechanisms, and clinical evidence. *Biochem Soc Trans* 51:1361–1375. <https://doi.org/10.1042/BST20230078>

Baker PW, Rye K-A, Gamble JR, et al (1999) Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Lipid Research* 40:345–353. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33375-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33375-7)

Ballout RA, Kong H, Sampson M, et al (2021) The NIH Lipo-COVID Study: A pilot NMR investigation of lipoprotein subfractions and other metabolites in patients with severe COVID-19. *Chemistry*

Barter PJ (1983) Evidence that lecithin: Cholesterol acyltransferase acts on both high-density and low-density lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 751:261–270. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(83\)90283-7](https://doi.org/10.1016/0005-2760(83)90283-7)

Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, et al (2003) Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for

Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. *ATVB* 23:160–167. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000054658.91146.64>

Barter PJ, Hopkins GJ, Calvert GD (1982) Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochem J* 208:1–7

Barter PJ, Nicholls S, Rye K-A, et al (2004) Antiinflammatory Properties of HDL. *Circulation Research* 95:764–772. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000146094.59640.13>

Barth JL, Argraves WS (2001) Cubilin and Megalin: Partners in Lipoprotein and Vitamin Metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine* 11:26–31. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00080-9)

Basu SK, Ho YK, Brown MS, et al (1982) Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 257:9788–9795. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34141-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34141-3)

Begue F, Tanaka S, Mouktadi Z, et al (2021) Altered high-density lipoprotein composition and functions during severe COVID-19. *Scientific Reports* 11:2291. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81638-1>

Beigneux AP, Davies BSJ, Gin P, et al (2007) Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons. *Cell Metab* 5:279–291. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.02.002>

Beimdiek J, Janciauskiene S, Wrenger S, et al (2022) Plasma markers of COVID-19 severity: a pilot study. *Respiratory Research* 23:343. <https://doi.org/10.1186/s12931-022-02272-7>

Bekaert ED, Alaupovic P, Knight-Gibson C, Ayrault-Jarrier M (1991) The lipoprotein A-II (LP-A-II) family in normolipidemic subjects and patients with Apo-AI deficiency. *Progress in Lipid Research* 30:151–157. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(91\)90011-S](https://doi.org/10.1016/0163-7827(91)90011-S)

Ben-Aicha S, Badimon L, Vilahur G (2020) Advances in HDL: Much More than Lipid Transporters. *Int J Mol Sci* 21:. <https://doi.org/10.3390/ijms21030732>

Benditt EP, Eriksen N (1977) Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:4025–4028

Berbée JFP, Coomans CP, Westerterp M, et al (2010) Apolipoprotein CI enhances the biological response to LPS via the CD14/TLR4 pathway by LPS-binding elements in both its N- and C-terminal helix. *J Lipid Res* 51:1943–1952. <https://doi.org/10.1194/jlr.M006809>

Berezhnoy G, Bissinger R, Liu A, et al (2023) Maintained imbalance of triglycerides, apolipoproteins, energy metabolites and cytokines in long-term COVID-19 syndrome patients. *Front Immunol* 14:1144224. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1144224>

Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RHA (2006) Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet* 38:S2–S7. <https://doi.org/10.1038/ng1794>

Berg K (1963) A NEW SERUM TYPE SYSTEM IN MAN--THE LP SYSTEM. *Acta Pathol Microbiol Scand* 59:369–382. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1963.tb01808.x>

Bergin DA, Reeves EP, Hurley K, et al (2014) The Circulating Proteinase Inhibitor  $\alpha$ -1 Antitrypsin Regulates Neutrophil Degranulation and Autoimmunity. *Sci Transl Med* 6:. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007116>

Bergt C, Pennathur S, Fu X, et al (2004) The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL



in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13032–13037. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405292101>

Berntsson J, Östling G, Persson M, et al (2016) Orosomucoid, Carotid Plaque, and Incidence of Stroke. *Stroke* 47:1858–1863. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013374>

Birmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, et al (2007) Apolipoprotein A-II Is Inversely Associated With Risk of Future Coronary Artery Disease. *Circulation* 116:2029–2035. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.704031>

Blanchard V, Garçon D, Jaunet C, et al (2020) A high-throughput mass spectrometry-based assay for large-scale profiling of circulating human apolipoproteins. *J Lipid Res* 61:1128–1139. <https://doi.org/10.1194/jlr.D120000835>

Blue ML, Williams DL, Zucker S, et al (1983) Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland, and liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:283–287. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.1.283>

Boisfer E, Lambert G, Atger V, et al (1999) Overexpression of Human Apolipoprotein A-II in Mice Induces Hypertriglyceridemia Due to Defective Very Low Density Lipoprotein Hydrolysis\*. *Journal of Biological Chemistry* 274:11564–11572. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11564>

Bolin DJ, Jonas A (1996) Sphingomyelin Inhibits the Lecithin-Cholesterol Acyltransferase Reaction with Reconstituted High Density Lipoproteins by Decreasing Enzyme Binding \*. *Journal of Biological Chemistry* 271:19152–19158. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.32.19152>

Botham KM, Bravo E (1995) The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Progress in Lipid Research* 34:71–97. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)00007-9](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)00007-9)

Bowry VW, Stanley KK, Stocker R (1992) High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10316–10320. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10316>

Breckenridge WC, Little JA, Steiner G, et al (1978) Hypertriglyceridemia Associated with Deficiency of Apolipoprotein C-II. *New England Journal of Medicine* 298:1265–1273. <https://doi.org/10.1056/NEJM197806082982301>

Brewer HB (1981) Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. *Klin Wochenschr* 59:1023–1035. <https://doi.org/10.1007/BF01747745>

Brewer HB, Lux SE, Ronan R, John KM (1972) Amino Acid Sequence of Human apoLp-Gln-II (apoA-II), an Apolipoprotein Isolated from the High-Density Lipoprotein Complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:1304–1308. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.5.1304>

Brewer HB, Zech LA, Gregg RE, et al (1983) NIH conference. Type III hyperlipoproteinemia: diagnosis, molecular defects, pathology, and treatment. *Ann Intern Med* 98:623–640. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-98-5-623>

Brinck JW, Thomas A, Lauer E, et al (2016) Diabetes Mellitus Is Associated With Reduced High-Density Lipoprotein Sphingosine-1-Phosphate Content and Impaired High-Density Lipoprotein Cardiac Cell Protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36:817–824.

<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.307049>

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, et al (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22:336–345. <https://doi.org/10.1038/11905>

Brown BE, Nobecourt E, Zeng J, et al (2013) Apolipoprotein A-I glycation by Glucose and Reactive Aldehydes Alters Phospholipid Affinity but Not Cholesterol Export from Lipid-Laden Macrophages. *PLoS One* 8:e65430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065430>

Brown RJ, Lagor WR, Sankaranarayanan S, et al (2010) Impact of combined deficiency of hepatic lipase and endothelial lipase on the metabolism of both high-density lipoproteins and apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Circ Res* 107:357–364. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219188>

Bryan Brewer H, Ronan R, Meng M, Bishop C (1986) [10] Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 223–246

Buck M, Gouwy M, Wang J, et al (2016) Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. *CMC* 23:1725–1755. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160418114600>

Burkard I, Von Eckardstein A, Waeber G, et al (2007) Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 194:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.09.026>

## C

Cabana VG, Feng N, Reardon CA, et al (2004) Influence of apoA-I and apoE on the formation of serum amyloid A-containing lipoproteins in vivo and in vitro. *Journal of Lipid Research* 45:317–325. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300414-JLR200>

Cai L, Ji A, de Beer FC, et al (2008) SR-BI protects against endotoxemia in mice through its roles in glucocorticoid production and hepatic clearance. *J Clin Invest* 118:364–375. <https://doi.org/10.1172/JCI31539>

Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, et al (1997) Inhibition of VCAM-1 Expression in Endothelial Cells by Reconstituted High Density Lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238:61–65. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7236>

Camont L, Lhomme M, Rached F, et al (2013) Small, Dense High-Density Lipoprotein-3 Particles Are Enriched in Negatively Charged Phospholipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33:2715–2723. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301468>

Cardner M, Yalcinkaya M, Goetze S, et al (2020) Structure-function relationships of HDL in diabetes and coronary heart disease. *JCI Insight* 5:. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.131491>

Cardouat G, Duparc T, Fried S, et al (2017) Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F1-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862:832–

841. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2017.05.005>

Carlson LA, Philipson B (1979) Fish-eye disease. A new familial condition with massive corneal opacities and dyslipoproteinaemia. *Lancet* 2:922–924

Casas AT, Hubsch AP, Rogers BC, Doran JE (1995) Reconstituted High-Density Lipoprotein Reduces LPS-Stimulated TNF $\alpha$ . *Journal of Surgical Research* 59:544–552. <https://doi.org/10.1006/jsre.1995.1204>

Catte A, Patterson JC, Jones MK, et al (2006) Novel Changes in Discoidal High Density Lipoprotein Morphology: A Molecular Dynamics Study. *Biophys J* 90:4345–4360. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071456>

Cem G, Irving K (1999) Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *The New England Journal of Medicine*

Chancharme L, Thérond P, Nigon F, et al (1999) Cholesteryl Ester Hydroperoxide Lability Is a Key Feature of the Oxidative Susceptibility of Small, Dense LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:810–820. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.3.810>

Chapman MJ (2022) HDL functionality in type 1 and type 2 diabetes: new insights. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 29:112–123. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000705>

Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM (1981) A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *Journal of Lipid Research* 22:339–358. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)35376-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)35376-1)

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, et al (2001) A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7:161–171. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00164-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00164-2)

Chen C-H, Albers JJ (1982) Distribution of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) in human plasma lipoprotein fractions. Evidence for the association of active LCAT with low density lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107:1091–1096. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)90633-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)90633-7)

Chen L, Deng H, Cui H, et al (2017) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9:7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>

Cheung MC, Albers JJ (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* 23:747–753. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38108-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38108-6)

Cheung MC, Albers JJ (1984) Characterization of lipoprotein particles isolated by immunoaffinity chromatography. Particles containing A-I and A-II and particles containing A-I but no A-II. *J Biol Chem* 259:12201–12209

Chidambaram V, Shanmugavel Geetha H, Kumar A, et al (2022) Association of Lipid Levels With COVID-19 Infection, Disease Severity and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med* 9:862999. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.862999>

Chien J-Y, Jerng J-S, Yu C-J, Yang P-C (2005) Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis\*: *Critical Care Medicine* 33:1688–1693.

<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000171183.79525.6B>

Cho K-H (2022) The Current Status of Research on High-Density Lipoproteins (HDL): A Paradigm Shift from HDL Quantity to HDL Quality and HDL Functionality. *Int J Mol Sci* 23:3967. <https://doi.org/10.3390/ijms23073967>

Christinat N, Masoodi M (2017) Comprehensive Lipoprotein Characterization Using Lipidomics Analysis of Human Plasma. *J Proteome Res* 16:2947–2953. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00236>

Christison J, Karjalainen A, Brauman J, et al (1996) Rapid reduction and removal of HDL- but not LDL-associated cholesteryl ester hydroperoxides by rat liver perfused in situ. *Biochem J* 314:739–742

Christison JK, Rye KA, Stocker R (1995) Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *Journal of Lipid Research* 36:2017–2026. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41119-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41119-8)

Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, et al (2011) Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:9613–9618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103187108>

Chroni A, Nieland T J F, Kypreos KE, et al (2005) SR-BI Mediates Cholesterol Efflux via Its Interactions with Lipid-Bound ApoE. Structural Mutations in SR-BI Diminish Cholesterol Efflux. *Biochemistry* 44:13132–13143. <https://doi.org/10.1021/bi051029o>

Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP (1980) Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. *Journal of Lipid Research* 21:284–291. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39807-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39807-2)

Clavey V, Lestavel-Delattre S, Copin C, et al (1995) Modulation of Lipoprotein B Binding to the LDL Receptor by Exogenous Lipids and Apolipoproteins CI, CII, CIII, and E. *ATVB* 15:963–971. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.7.963>

Clay MA, Newnham HH, Forte TM, Barter PI (1992) Cholesteryl ester transfer protein and hepatic lipase activity promote shedding of apo A-I from HDL and subsequent formation of discoidal HDL. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1124:52–58. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90125-F](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90125-F)

Cochran BJ, Ong K-L, Manandhar B, Rye K-A (2021) High Density Lipoproteins and Diabetes. *Cells* 10:850. <https://doi.org/10.3390/cells10040850>

Cockerill GW, Rye K-A, Gamble JR, et al (1995) High-Density Lipoproteins Inhibit Cytokine-Induced Expression of Endothelial Cell Adhesion Molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 15:1987–1994. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.15.11.1987>

Coelho DR, Carneiro PH, Mendes-Monteiro L, et al (2021) ApoA1 Neutralizes Proinflammatory Effects of Dengue Virus NS1 Protein and Modulates Viral Immune Evasion. *J Virol* 95:e0197420. <https://doi.org/10.1128/JVI.01974-20>

Coetzee GA, Strachan AF, Van Der Westhuyzen DR, et al (1986) Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *Journal of Biological Chemistry* 261:9644–9651. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67562-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67562-3)

Coffill CR, Ramsamy TA, Hutt DM, et al (1997) Diacylglycerol is the preferred substrate in high density lipoproteins for human hepatic lipase. *Journal of Lipid Research* 38:2224–2231. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34936-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34936-1)

Cohn JS, Patterson BW, Uffelman KD, et al (2004) Rate of Production of Plasma and Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL) Apolipoprotein C-III Is Strongly Related to the Concentration and Level of Production of VLDL Triglyceride in Male Subjects with Different Body Weights and Levels of Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:3949–3955. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-032056>

Collins LA, Mirza SP, Kissebah AH, Olivier M (2010) Integrated approach for the comprehensive characterization of lipoproteins from human plasma using FPLC and nano-HPLC-tandem mass spectrometry. *Physiol Genomics* 40:208–215. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00136.2009>

Cunin P, Beauvillain C, Miot C, et al (2016) Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death Dis* 7:e2215–e2215. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.113>

Curtiss LK, Witztum JL (1985) Plasma apolipoproteins AI, AII, B, CI, and E are glucosylated in hyperglycemic diabetic subjects. *Diabetes* 34:452–461. <https://doi.org/10.2337/diab.34.5.452>

## D

Darabi M, Lhomme M, Dahik VD, et al (2022) Phosphatidylserine enhances anti-inflammatory effects of reconstituted HDL in macrophages via distinct intracellular pathways. *FASEB J* 36:e22274. <https://doi.org/10.1096/fj.201800810R>

Dashty M, Motazacker M, Levels J, et al (2014) Proteome of human plasma very low-density lipoprotein and low-density lipoprotein exhibits a link with coagulation and lipid metabolism. *Thromb Haemost* 111:518–530. <https://doi.org/10.1160/TH13-02-0178>

Davidson WS, Shah AS, Sexmith H, Gordon SM (2022) The HDL Proteome Watch: Compilation of studies leads to new insights on HDL function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1867:159072. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159072>

Davidson WS, Silva RAGD, Chantepie S, et al (2009) Proteomic Analysis of Defined HDL Subpopulations Reveals Particle-Specific Protein Clusters: Relevance to Antioxidative Function. *ATVB* 29:870–876. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186031>

Davidson WS, Sparks DL, Lund-Katz S, Phillips MC (1994) The molecular basis for the difference in charge between pre-beta- and alpha-migrating high density lipoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 269:8959–8965. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37061-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37061-8)

Davidson WS, Thompson TB (2007) The Structure of Apolipoprotein A-I in High Density Lipoproteins \*. *Journal of Biological Chemistry* 282:22249–22253. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700014200>

Day JR, Albers JJ, Lofton-Day CE, et al (1994) Complete cDNA encoding human phospholipid transfer

protein from human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 269:9388–9391. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37120-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37120-X)

De Buck M, Gouwy M, Wang JM, et al (2016) The cytokine-serum amyloid A-chemokine network. *Cytokine Growth Factor Rev* 30:55–69. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.010>

de la Llera Moya M, McGillicuddy FC, Hinkle CC, et al (2012) Inflammation Modulates Human HDL Composition and Function in vivo. *Atherosclerosis* 222:390–394. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.02.032>

de Menezes DC, de Lima PDL, de Lima IC, et al (2023) Metabolic Profile of Patients with Long COVID: A Cross-Sectional Study. *Nutrients* 15:1197. <https://doi.org/10.3390/nu15051197>

De Nardo D, Labzin LI, Kono H, et al (2014) High density lipoprotein mediates anti-inflammatory transcriptional reprogramming of macrophages via the transcriptional repressor ATF3. *Nat Immunol* 15:152–160. <https://doi.org/10.1038/ni.2784>

De Silva HV, Harmony JAK, Stuart WD, et al (1990) Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* 29:5380–5389. <https://doi.org/10.1021/bi00474a025>

De Souza JA, Vindis C, Nègre-Salvayre A, et al (2010) Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med* 14:608–620. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00713.x>

Deakin S, Leviev I, Gomaraschi M, et al (2002) Enzymatically Active Paraoxonase-1 Is Located at the External Membrane of Producing Cells and Released by a High Affinity, Saturable, Desorption Mechanism\*. *Journal of Biological Chemistry* 277:4301–4308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107440200>

DeKroon RM, Mihovilovic M, Goodger ZV, et al (2003) ApoE genotype-specific inhibition of apoptosis. *Journal of Lipid Research* 44:1566–1573. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300097-JLR200>

Delalla OF, Elliott HA, Gofman JW (1954) Ultracentrifugal Studies of High Density Serum Lipoproteins in Clinically Healthy Adults. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 179:333–337. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1954.179.2.333>

Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, et al (2011) Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem Rev* 111:6130–6185. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

Di Bartolo BA, Nicholls SJ, Bao S, et al (2011a) The apolipoprotein A-I mimetic peptide ETC-642 exhibits anti-inflammatory properties that are comparable to high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 217:395–400. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.001>

Di Bartolo BA, Vanags LZ, Tan JT, et al (2011b) The apolipoprotein A-I mimetic peptide, ETC-642, reduces chronic vascular inflammation in the rabbit. *Lipids Health Dis* 10:224. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-224>

Diditchenko S, Gille A, Pragst I, et al (2013) Novel Formulation of a Reconstituted High-Density Lipoprotein (CSL112) Dramatically Enhances ABCA1-Dependent Cholesterol Efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33:2202–2211. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301981>

Dijkers A, Tietge UJ (2010) Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World Journal of*

Gastroenterology 16:5936–5945. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i47.5936>

Domingo-Espín J, Nilsson O, Bernfur K, et al (2018) Site-specific glycosylations of apolipoprotein A-I lead to differentiated functional effects on lipid-binding and on glucose metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864:2822–2834. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.05.014>

Dominiczak MH, Caslake MJ (2011) Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem* 48:498–515. <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011111>

Draganov D, Teiber J, Watson C, et al (2010) PON1 and Oxidative Stress in Human Sepsis and an Animal Model of Sepsis. In: Reddy ST (ed) *Paraoxonases in Inflammation, Infection, and Toxicology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 89–97

Draganov DI, La Du BN (2004) Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369:78–88. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1>

Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, et al (2005) Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research* 46:1239–1247. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400511-JLR200>

Drayna D, Fielding C, McLean J, et al (1986) Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *Journal of Biological Chemistry* 261:16535–16539. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66599-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66599-8)

Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, et al (2009) High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 119:2103–2111. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.843219>

Duchateau PN, Movsesyan I, Yamashita S, et al (2000) Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. *Journal of Lipid Research* 41:1231–1236. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33430-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33430-1)

Duchateau PN, Pullinger CR, Orellana RE, et al (1997) Apolipoprotein L, a New Human High Density Lipoprotein Apolipoprotein Expressed by the Pancreas: IDENTIFICATION, CLONING, CHARACTERIZATION, AND PLASMA DISTRIBUTION OF APOLIPOPROTEIN L\*. *Journal of Biological Chemistry* 272:25576–25582. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25576>

Duong M, Psaltis M, Rader DJ, et al (2003) Evidence That Hepatic Lipase and Endothelial Lipase Have Different Substrate Specificities for High-Density Lipoprotein Phospholipids. *Biochemistry* 42:13778–13785. <https://doi.org/10.1021/bi034990n>

Duran EK, Aday AW, Cook NR, et al (2020) Triglyceride-Rich Lipoprotein Cholesterol, Small Dense LDL Cholesterol, and Incident Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 75:2122–2135. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.02.059>

Durrington P (2023) Blood lipids after COVID-19 infection. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 11:68–69. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00389-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00389-8)

# E

- Easton R, Gille A, D'Andrea D, et al (2014) A multiple ascending dose study of CSL112, an infused formulation of ApoA-I. *The Journal of Clinical Pharmacy* 54:301–310. <https://doi.org/10.1002/jcph.194>
- Edmondson AC, Brown RJ, Kathiresan S, et al (2009) Loss-of-function variants in endothelial lipase are a cause of elevated HDL cholesterol in humans. *J Clin Invest* 119:1042–1050. <https://doi.org/10.1172/JCI37176>
- Elovson J, Chatterton JE, Bell GT, et al (1988) Plasma very low density lipoproteins contain a single molecule of apolipoprotein B. *J Lipid Res* 29:1461–1473
- Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, et al (1989) Platelet-activating Factor Acetylhydrolase Increases during Macrophage Differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 264:8467–8470. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)81811-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)81811-7)
- Escolà-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta À, et al (2001) ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *Journal of Lipid Research* 42:241–248. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31685-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31685-0)

# F

- Faguer S, Del Bello A, Danet C, et al (2022) Apolipoprotein-A-I for severe COVID-19-induced hyperinflammatory states: A prospective case study. *Front Pharmacol* 13:936659. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.936659>
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, et al (2005) A comprehensive classification system for lipids<sup>1</sup>. *Journal of Lipid Research* 46:839–861. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>
- Fan J, Wang H, Ye G, et al (2020) Letter to the Editor: Low-density lipoprotein is a potential predictor of poor prognosis in patients with coronavirus disease 2019. *Metabolism* 107:154243. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154243>
- Farbstein D, Levy AP (2012) HDL dysfunction in diabetes: causes and possible treatments. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 10:353–361. <https://doi.org/10.1586/erc.11.182>
- Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, et al (1999) A Null Mutation in Murine CD36 Reveals an Important Role in Fatty Acid and Lipoprotein Metabolism \*. *Journal of Biological Chemistry* 274:19055–19062. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19055>
- Feingold K, Staprans I, Memon R, et al (1992) Endotoxin rapidly induces changes in lipid metabolism that produce hypertriglyceridemia: low doses stimulate hepatic triglyceride production while high doses inhibit clearance. *Journal of Lipid Research* 33:1765–1776. <https://doi.org/10.1016/S0022->



2275(20)41334-3

Feingold KR (2000) Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. (eds) Endotext. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA)

Feingold KR, Marshall M, Gulli R, et al (1994) Effect of endotoxin and cytokines on lipoprotein lipase activity in mice. *Arterioscler Thromb* 14:1866–1872. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.14.11.1866>

Feingold KR, Memon RA, Moser AH, Grunfeld C (1998) Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 139:307–315. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00084-7)

Feng M, Darabi M, Tubeuf E, et al (2020) Free cholesterol transfer to high-density lipoprotein (HDL) upon triglyceride lipolysis underlies the U-shape relationship between HDL-cholesterol and cardiovascular disease. *European Journal of Preventive Cardiology* 27:1606–1616. <https://doi.org/10.1177/2047487319894114>

Fernandes CL, Ligabue-Braun R, Verli H (2015) Structural glycobiology of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and its implications for pharmacokinetics and inflammation. *Glycobiology* 25:1125–1133. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv041>

Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, et al (2001) Effect of glycation of high density lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetologica* 38:163–169. <https://doi.org/10.1007/s592-001-8074-z>

Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE (1972) A protein cofactor of lecithin:Cholesterol acyltransferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46:1493–1498. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(72\)90776-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(72)90776-0)

Fisher EA, Zhou M, Mitchell DM, et al (1997) The Degradation of Apolipoprotein B100 Is Mediated by the Ubiquitin-proteasome Pathway and Involves Heat Shock Protein 70. *Journal of Biological Chemistry* 272:20427–20434. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20427>

Fisher WR, Schumaker VN (1986) [11] Isolation and characterization of apolipoprotein B-100. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 247–262

Fless GM, Rolih CA, Scanu AM (1984) Heterogeneity of human plasma lipoprotein (a). Isolation and characterization of the lipoprotein subspecies and their apoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 259:11470–11478. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90885-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90885-9)

Föger B, Ritsch A, Doblinger A, et al (1996) Relationship of plasma cholesteryl ester transfer protein to HDL cholesterol. Studies in normotriglyceridemia and moderate hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1430–1436. <https://doi.org/10.1161/01.atv.16.12.1430>

Fong LG, Young SG, Beigneux AP, et al (2016) GPIHBP1 and plasma triglyceride metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 27:455–469. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.04.013>

Franceschini G (1996) Apolipoprotein function in health and disease: insights from natural mutations. *European Journal of Clinical Investigation* 26:733–746. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1996.2120536.x>

Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, et al (1980) A-IMilano apoprotein. Decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical

atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest* 66:892–900. <https://doi.org/10.1172/JCI109956>

Frank PG, Marcel YL (2000) Apolipoprotein A-I: structure–function relationships. *Journal of Lipid Research* 41:853–872. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32028-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32028-9)

Fujimoto K, Machidori H, Iwakiri R, et al (1993) Effect of intravenous administration of apolipoprotein A-IV on patterns of feeding, drinking and ambulatory activity of rats. *Brain Res* 608:233–237. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91463-3](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91463-3)

Funke H, Boyles J, Weisgraber KH, et al (1984) Uptake of apolipoprotein E-containing high density lipoproteins by hepatic parenchymal cells. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc* 4:452–461. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.4.5.452>

## G

Gadek JE, Fells GA, Zimmerman RL, et al (1981) Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest* 68:889–898

Garner B, Waldeck AR, Witting PK, et al (1998) Oxidation of High Density Lipoproteins: II. EVIDENCE FOR DIRECT REDUCTION OF LIPID HYDROPEROXIDES BY METHIONINE RESIDUES OF APOLIPOPROTEINS AI AND AII \*. *Journal of Biological Chemistry* 273:6088–6095. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.11.6088>

Gauthamadasa K, Rosales C, Pownall HJ, et al (2010) Speciated Human High Density Lipoprotein Protein Proximity Profiles. *Biochemistry* 49:10656–10665. <https://doi.org/10.1021/bi1015452>

Gautier T, Lagrost L (2011) Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in ‘reverse lipopolysaccharide transport’ and innate immunity. *Biochemical Society Transactions* 39:984–988. <https://doi.org/10.1042/BST0390984>

Gautier T, Masson D, Barros J-PP de, et al (2000) Human Apolipoprotein C-I Accounts for the Ability of Plasma High Density Lipoproteins to Inhibit the Cholesteryl Ester Transfer Protein Activity \*. *Journal of Biological Chemistry* 275:37504–37509. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007210200>

Gazi IF, Apostolou FA, Liberopoulos EN, et al (2011) Leptospirosis is Associated with Markedly Increased Triglycerides and Small Dense Low-Density Lipoprotein and Decreased High-Density Lipoprotein. *Lipids* 46:953–960. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3580-y>

Gelissen IC, Harris M, Rye K-A, et al (2006) ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26:534–540. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000200082.58536.e1>

Geyer PE, Arend FM, Doll S, et al (2021) High-resolution serum proteome trajectories in COVID-19 reveal patient-specific seroconversion. *EMBO Molecular Medicine* 13:e14167. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114167>

Ghiselli G, Krishnan S, Beigel Y, Gotto AM (1988) Plasma metabolism of apolipoprotein A-IV in humans. *Journal of Lipid Research* 27:813–827. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38785-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38785-X)

Gibson CM, Kastelein JJP, Phillips AT, et al (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>

Gibson CM, Kazmi SHA, Korjian S, et al (2022) CSL112 (Apolipoprotein A-I [Human]) Strongly Enhances Plasma ApoA-I and Cholesterol Efflux Capacity in Post-Acute Myocardial Infarction Patients: A PK/PD Substudy of the AEGIS-I Trial. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 27:10742484221121507. <https://doi.org/10.1177/10742484221121507>

Gille A, Duffy D, Tortorici MA, et al (2019) Moderate Renal Impairment Does Not Impact the Ability of CSL112 (Apolipoprotein A-I [Human]) to Enhance Cholesterol Efflux Capacity. *J Clin Pharmacol* 59:427–436. <https://doi.org/10.1002/jcph.1337>

Gille A, Easton R, D'Andrea D, et al (2014) CSL112 Enhances Biomarkers of Reverse Cholesterol Transport After Single and Multiple Infusions in Healthy Subjects. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34:2106–2114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303720>

Ginsberg HN, Packard CJ, Chapman MJ, et al (2021) Triglyceride-rich lipoproteins and their remnants: metabolic insights, role in atherosclerotic cardiovascular disease, and emerging therapeutic strategies—a consensus statement from the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal* 42:4791–4806. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab551>

Girona J, Amigó N, Ibarretxe D, et al (2019) HDL Triglycerides: A New Marker of Metabolic and Cardiovascular Risk. *Int J Mol Sci* 20:3151. <https://doi.org/10.3390/ijms20133151>

Glomset JA, Janssen ET, Kennedy R, Dobbins J (1966) Role of plasma lecithin:cholesterol acyltransferase in the metabolism of high density lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 7:639–648. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39245-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39245-2)

Gofman JW, Lindgren FT, Elliott H (1949) Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 179:973–979

Gofman JW, Rubin L, McGinley JP, Jones HB (1954) Hyperlipoproteinemia. *The American Journal of Medicine* 17:514–520. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(54\)90126-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(54)90126-6)

Goldberg IJ (2001) Diabetic Dyslipidemia: Causes and Consequences. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86:965–971. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7304>

Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, et al (1990) Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem* 265:4266–4272

Goldstein JL, Brown MS (2009) The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29:431–438. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179564>

Goldstein JL, Brown MS (2015) A Century of Cholesterol and Coronaries: From Plaques to Genes to Statins. *Cell* 161:161–172. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.036>

Gomez Rosso L, Lhomme M, Meroño T, et al (2017) Poor glycemic control in type 2 diabetes enhances functional and compositional alterations of small, dense HDL3c. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862:188–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.014>

Gornik O, Wagner J, Pučić M, et al (2009) Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*

19:1547–1553. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp134>

Goulinet S, Chapman MJ (1997) Plasma LDL and HDL Subspecies Are Heterogenous in Particle Content of Tocopherols and Oxygenated and Hydrocarbon Carotenoids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:786–796. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.4.786>

Goyal J, Wang K, Liu M, Subbaiah PV (1997) Novel Function of Lecithin-Cholesterol Acyltransferase: HYDROLYSIS OF OXIDIZED POLAR PHOSPHOLIPIDS GENERATED DURING LIPOPROTEIN OXIDATION\*. *Journal of Biological Chemistry* 272:16231–16239. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16231>

Graham A (2023) Modulation of the Cellular microRNA Landscape: Contribution to the Protective Effects of High-Density Lipoproteins (HDL). *Biology* 12:1232. <https://doi.org/10.3390/biology12091232>

Grao-Cruces E, Lopez-Enriquez S, Martin ME, Montserrat-de la Paz S (2022) High-density lipoproteins and immune response: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 195:117–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.009>

Graversen JH, Castro G, Kandoussi A, et al (2008) A Pivotal Role of the Human Kidney in Catabolism of HDL Protein Components Apolipoprotein A-I and A-IV but not of A-II. *Lipids* 43:467–470. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3169-2>

Green PHR, Glickman RM, Riley JW, Quinet E (1980) Human Apolipoprotein A-IV: *INTESTINAL ORIGIN AND DISTRIBUTION IN PLASMA*. *J Clin Invest* 65:911–919. <https://doi.org/10.1172/JCI109745>

Grefhorst A, Verkade HJ, Groen AK (2019) The TICE Pathway: Mechanisms and Lipid-Lowering Therapies. *Methodist Debakey Cardiovasc J* 15:70–76. <https://doi.org/10.14797/mdcj-15-1-70>

Gropp K, Weber N, Reuter M, et al (2011)  $\beta$ 2-glycoprotein I, the major target in antiphospholipid syndrome, is a special human complement regulator. *Blood* 118:2774–2783. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339564>

Gruaz L, Delucinge-Vivier C, Descombes P, et al (2010) Blockade of T Cell Contact-Activation of Human Monocytes by High-Density Lipoproteins Reveals a New Pattern of Cytokine and Inflammatory Genes. *PLoS One* 5:e9418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009418>

Grunfeld C, Marshall M, Shigenaga JK, et al (1999) Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid. *Journal of Lipid Research* 40:245–252. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)33363-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)33363-0)

Guo L, Morin EE, Yu M, et al (2022) Replenishing HDL with synthetic HDL has multiple protective effects against sepsis in mice. *Sci Signal* 15:eabl9322. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abl9322>

Gutsmann T, Müller M, Carroll SF, et al (2001) Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infection and Immunity* 69:6942–6950. <https://doi.org/10.1128/iai.69.11.6942-6950.2001>

Gyawali B, Ramakrishna K, Dharamoon AS (2019) Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Medicine* 7:. <https://doi.org/10.1177/2050312119835043>

# H

- Hafiane A, Genest J (2015) High density lipoproteins: Measurement techniques and potential biomarkers of cardiovascular risk. *BBA Clin* 3:175–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.01.005>
- Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, et al (1996) Neutralization and Transfer of Lipopolysaccharide by Phospholipid Transfer Protein (\*). *Journal of Biological Chemistry* 271:12172–12178. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12172>
- Hamilton RL, Williams MC, Fielding CJ, Havel RJ (1976) Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J Clin Invest* 58:667–680. <https://doi.org/10.1172/JCI108513>
- Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS (2000) Megalin Acts in Concert with Cubilin to Mediate Endocytosis of High Density Lipoproteins\*. *Journal of Biological Chemistry* 275:12003–12008. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.16.12003>
- Han R, Lai R, Ding Q, et al (2007) Apolipoprotein A-I stimulates AMP-activated protein kinase and improves glucose metabolism. *Diabetologia* 50:1960–1968. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0752-7>
- Hardman DA, Kane JP (1986) [12] Isolation and characterization of apolipoprotein B-48. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 262–272
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al (2004) Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 11:412–419. <https://doi.org/10.1038/nsmb767>
- Harsløf M, Pedersen KM, Afzal S, et al (2023) Lower levels of small HDL particles associated with increased infectious disease morbidity and mortality: a population-based cohort study of 30 195 individuals. *Cardiovascular Research* 119:957–968. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac194>
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34:1345–1353. <https://doi.org/10.1172/JCI103182>
- Hedrick CC, Thorpe SR, Fu M-X, et al (2000) Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 43:312–320. <https://doi.org/10.1007/s001250050049>
- Henning MF, Herlax V, Bakás L (2011) Contribution of the C-terminal end of apolipoprotein AI to neutralization of lipopolysaccharide endotoxic effect. *Innate Immun* 17:327–337. <https://doi.org/10.1177/1753425910370709>
- Hesler CB, Swenson TL, Tall AR (1987) Purification and characterization of a human plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Biol Chem* 262:2275–2282
- Hirata K, Ishida T, Matsushita H, et al (2000) Regulated Expression of Endothelial Cell-Derived Lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 272:90–93.

<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2747>

Hirotsu T, Yamamoto M, Kumagai Y, et al (2005) Regulation of lipopolysaccharide-inducible genes by MyD88 and Toll/IL-1 domain containing adaptor inducing IFN- $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328:383–392. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.184>

Hla T, Maciag T (1990) An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* 265:9308–9313. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38849-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38849-0)

Hoang A, Murphy AJ, Coughlan MT, et al (2007) Advanced glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-atherogenic properties. *Diabetologia* 50:1770–1779. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0718-9>

Hocheple T, Berger FG, Baumann H, Libert C (2003)  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14:25–34. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00054-0)

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al (2020) SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 181:271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>

Hori M, Imamura T, Narang N, et al (2021) Triglyceride and Small Dense LDL-Cholesterol in Patients with Acute Coronary Syndrome. *J Clin Med* 10:4607. <https://doi.org/10.3390/jcm10194607>

Hu B, Huang S, Yin L (2021) The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology* 93:250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>

Hu X, Chen D, Wu L, et al (2020) Declined serum high density lipoprotein cholesterol is associated with the severity of COVID-19 infection. *Clinica Chimica Acta* 510:105–110. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.07.015>

Huang C, Wang Y, Li X, et al (2020a) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395:497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)

Huang J, Wang D, Huang L-H, Huang H (2020b) Roles of Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Disease: A New Paradigm for Drug Discovery. *IJMS* 21:739. <https://doi.org/10.3390/ijms21030739>

Huang W, Li C, Wang Z, et al (2020c) Decreased serum albumin level indicates poor prognosis of COVID-19 patients: hepatic injury analysis from 2,623 hospitalized cases. *Sci China Life Sci* 63:1678–1687. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1733-4>

Huang Y, Mahley RW (2014) Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol Dis* 72PA:3–12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.025>

Hubsch AP, Casas AT, Doran JE (1995) Protective effects of reconstituted high-density lipoprotein in rabbit gram-negative bacteremia models. *J Lab Clin Med* 126:548–558

Hussain MM, Maxfield FR, Más-Oliva J, et al (1991) Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 266:13936–13940. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92792-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92792-4)

Hussain MM, Shi J, Dreizen P (2003) Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-

lipoprotein assembly. *Journal of Lipid Research* 44:22–32. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200014-JLR200>  
Hyka N, Dayer JM, Modoux C, et al (2001) Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes. *Blood* 97:2381–2389. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.8.2381>

## I

Iqbal J, Hussain MM (2009) Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 296:E1183–E1194. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90899.2008>

Itabe H, Hosoya R, Karasawa K, et al (1999) Metabolism of Oxidized Phosphatidylcholines Formed in Oxidized Low Density Lipoprotein by Lecithin-Cholesterol Acyltransferase1. *The Journal of Biochemistry* 126:153–161. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022416>

Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, et al (2017) Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017:1–10. <https://doi.org/10.1155/2017/1273042>

Iwata A, Miura S, Zhang B, et al (2011) Antiatherogenic effects of newly developed apolipoprotein A-I mimetic peptide/phospholipid complexes against aortic plaque burden in Watanabe-heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 218:300–307. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.05.029>

## J

Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, et al (2005) The nucleotide receptor P2Y<sub>13</sub> is a key regulator of hepatic High-Density Lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 62:2508–2515. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5194-0>

Jahangiri A, Rader DJ, Marchadier D, et al (2005) Evidence that endothelial lipase remodels high density lipoproteins without mediating the dissociation of apolipoprotein A-I. *Journal of Lipid Research* 46:896–903. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400212-JLR200>

Jahn CE, Osborne JC, Schaefer EJ, Brewer HB (1983) Activation of the Enzymic Activity of Hepatic Lipase by Apolipoprotein A-II. Characterization of a Major Component of High Density Lipoprotein as the Activating Plasma Component in vitro. *Eur J Biochem* 131:25–29. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07227.x>

Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al (1999) A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 21:424–428. <https://doi.org/10.1038/7766>

Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, et al (2022) Pathophysiology of

Atherosclerosis. International Journal of Molecular Sciences 23:3346.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23063346>

Jeyarajah EJ, Cromwell WC, Otvos JD (2006) Lipoprotein Particle Analysis by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Clinics in Laboratory Medicine 26:847–870.  
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2006.07.006>

Ji ZS, Fazio S, Lee YL, Mahley RW (1994) Secretion-capture role for apolipoprotein E in remnant lipoprotein metabolism involving cell surface heparan sulfate proteoglycans. Journal of Biological Chemistry 269:2764–2772. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42009-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42009-6)

Johannsen TH, Kamstrup PR, Andersen RV, et al (2009) Hepatic Lipase, Genetically Elevated High-Density Lipoprotein, and Risk of Ischemic Cardiovascular Disease. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 94:1264–1273. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1342>

Jonas A (1991) Lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of high-density lipoproteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1084:205–220. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90062-M](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90062-M)

Jonas A, Phillips MC (2008) Lipoprotein structure. In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. Elsevier, pp 485–506

Jørgensen AB, Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A (2014) Loss-of-Function Mutations in APOC3 and Risk of Ischemic Vascular Disease. N Engl J Med 371:32–41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308027>

# K

Kalayci A, Gibson CM, Ridker PM, et al (2022) ApoA-I Infusion Therapies Following Acute Coronary Syndrome: Past, Present, and Future. Curr Atheroscler Rep 24:585–597. <https://doi.org/10.1007/s11883-022-01025-7>

Kallend DG, Reijers J a. A, Bellibas SE, et al (2016) A single infusion of MDCO-216 (ApoA-1 Milano/POPC) increases ABCA1-mediated cholesterol efflux and pre-beta 1 HDL in healthy volunteers and patients with stable coronary artery disease. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother 2:23–29. <https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvv041>

Kalogeris TJ, Fukagawa K, Tso P (1994) Synthesis and lymphatic transport of intestinal apolipoprotein A-IV in response to graded doses of triglyceride. Journal of Lipid Research 35:1141–1151. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39959-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39959-4)

Kane JP, Hardman DA, Paulus HE (1980) Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. Proceedings of the National Academy of Sciences 77:2465–2469. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2465>

Kärkkäinen M, Oka T, Olkkonen VM, et al (2002) Isolation and Partial Characterization of the Inactive and Active Forms of Human Plasma Phospholipid Transfer Protein (PLTP) \*. Journal of Biological



Chemistry 277:15413–15418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112247200>

Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M (2005a) Lipoproteomics II: Mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5:1431–1445. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401010>

Karlsson H, Leanderson P, Tagesson C, Lindahl M (2005b) Lipoproteomics I: Mapping of proteins in low-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 5:551–565. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300938>

Kawano K, Qin S-C, Lin M, et al (2000) Cholesteryl Ester Transfer Protein and Phospholipid Transfer Protein Have Nonoverlapping Functions in Vivo \*. *Journal of Biological Chemistry* 275:29477–29481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003523200>

Keyserling CH, Barbaras R, Benghozi R, Dasseux J-L (2017) Development of CER-001: Preclinical Dose Selection Through to Phase I Clinical Findings. *Clin Drug Investig* 37:483–491. <https://doi.org/10.1007/s40261-017-0506-3>

Kheniser KG, Osme A, Kim C, et al (2020) Temporal Dynamics of High-Density Lipoprotein Proteome in Diet-Controlled Subjects with Type 2 Diabetes. *Biomolecules* 10:520. <https://doi.org/10.3390/biom10040520>

Khetarpal SA, Vitali C, Levin MG, et al (2021) Endothelial lipase mediates efficient lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins. *PLOS Genetics* 17:e1009802. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009802>

Kielar D, Dietmaier W, Langmann T, et al (2001) Rapid Quantification of Human ABCA1 mRNA in Various Cell Types and Tissues by Real-Time Reverse Transcription-PCR. *Clinical Chemistry* 47:2089–2097. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2089>

Kimura T, Sato K, Malchinkhuu E, et al (2003) High-Density Lipoprotein Stimulates Endothelial Cell Migration and Survival Through Sphingosine 1-Phosphate and Its Receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23:1283–1288. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000079011.67194.5A>

Kimura T, Tomura H, Mogi C, et al (2006) Role of Scavenger Receptor Class B Type I and Sphingosine 1-Phosphate Receptors in High Density Lipoprotein-induced Inhibition of Adhesion Molecule Expression in Endothelial Cells \*. *Journal of Biological Chemistry* 281:37457–37467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605823200>

Kingwell BA, Chapman MJ (2013) Future of High-Density Lipoprotein Infusion Therapies. *Circulation* 128:1112–1121. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002683>

Kiyozuka K, Zhao X, Konishi A, et al (2023) Apolipoprotein M supports S1P production and conservation and mediates prolonged Akt activation via S1PR1 and S1PR3. *The Journal of Biochemistry* 174:253–266. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad037>

Klimov AN, Gurevich VS, Nikiforova AA, et al (1993) Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo. *Atherosclerosis* 100:13–18. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(93\)90063-Z](https://doi.org/10.1016/0021-9150(93)90063-Z)

Kluve-Beckerman B, Drumm ML, Benson MD (1991) Nonexpression of the Human Serum Amyloid A Three (SAA3) Gene. *DNA and Cell Biology* 10:651–661. <https://doi.org/10.1089/dna.1991.10.651>

Knoell DL, Ralston DR, Coulter KR, Wewers MD (1998) Alpha 1-antitrypsin and Protease Complexation Is Induced by Lipopolysaccharide, Interleukin-1  $\beta$ , and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  in Monocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 157:246–255. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.1.9702033>

Kojima Y, Hirata K, Ishida T, et al (2004) Endothelial Lipase Modulates Monocyte Adhesion to the Vessel Wall. *Journal of Biological Chemistry* 279:54032–54038. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411112200>

Kolleck I, Schlame M, Fechner H, et al (1999) HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 27:882–890. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00139-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00139-2)

Kontush A, Chapman MJ (2011) *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function, and Therapeutics*, 1st edn. Wiley

Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ (2013) Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res* 54:2950–2963. <https://doi.org/10.1194/jlr.R036095>

Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, et al (2015) Structure of HDL: Particle Subclasses and Molecular Components. In: Von Eckardstein A, Kardassis D (eds) *High Density Lipoproteins*. Springer International Publishing, Cham, pp 3–51

Kontush A, Therond P, Zerrad A, et al (2007) Preferential Sphingosine-1-Phosphate Enrichment and Sphingomyelin Depletion Are Key Features of Small Dense HDL3 Particles. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27:1843–1849. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.145672>

Kosek AB, Durbin D, Jonas A (1999) Binding Affinity and Reactivity of Lecithin Cholesterol Acyltransferase with Native Lipoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258:548–551. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0690>

Kostka K, Roel E, Trinh NTH, et al (2023) “The burden of post-acute COVID-19 symptoms in a multinational network cohort analysis.” *Nat Commun* 14:7449. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42726-0>

Kotani K, Satoh N, Kato Y, et al (2009) A novel oxidized low-density lipoprotein marker, serum amyloid A-LDL, is associated with obesity and the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 204:526–531. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.017>

Kozarsky KF, Donahue MH, Rigotti A, et al (1997) Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387:414–417. <https://doi.org/10.1038/387414a0>

Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, et al (1999) The intrinsic factor–vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. *Nat Med* 5:656–661. <https://doi.org/10.1038/9504>

Krause BR, Remaley AT (2013) Reconstituted HDL for the acute treatment of acute coronary syndrome. *Current Opinion in Lipidology* 24:480–486. <https://doi.org/10.1097/MOL.000000000000020>

Krauss RM, Burke DJ (1982) Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *Journal of Lipid Research* 23:97–104. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38178-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38178-5)

Kulkarni KR (2006) Cholesterol Profile Measurement by Vertical Auto Profile Method. *Clinics in Laboratory Medicine* 26:787–802. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2006.07.004>

# L

- Lappegård KT, Kjellmo CA, Hovland A (2021) High-Density Lipoprotein Subfractions: Much Ado about Nothing or Clinically Important? *Biomedicines* 9:836. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070836>
- LaRosa JC, Levy RI, Herbert P, et al (1970) A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 41:57–62. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(70\)90468-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(70)90468-7)
- Larrede S, Quinn CM, Jessup W, et al (2009) Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29:1930–1936. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194548>
- Layne SP, Walters K-A, Kash JC, Taubenberger JK (2022) More autopsy studies are needed to understand the pathogenesis of severe COVID-19. *Nat Med* 28:427–428. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01684-8>
- Le May C, Berger JM, Lespine A, et al (2013) Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33:1484–1493. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300263>
- Lerch PG, Förtsch V, Hodler G, Bolli R (1996) Production and characterization of a reconstituted high density lipoprotein for therapeutic applications. *Vox Sang* 71:155–164. <https://doi.org/10.1046/j.1423-0410.1996.7130155.x>
- Levels JHM, Abraham PR, van den Ende A, van Deventer SJH (2001) Distribution and Kinetics of Lipoprotein-Bound Endotoxin. *Infect Immun* 69:2821–2828. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.2821-2828.2001>
- Levkau B (2015) HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol* 6:243. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00243>
- Li AC, Glass CK (2004) PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* 45:2161–2173. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400010-JLR200>
- Li B, Vachali P, Chang F-Y, et al (2022) HDL Is the Primary Transporter for Carotenoids from Liver to Retinal Pigment Epithelium in Transgenic ApoA-I<sup>-/-</sup>/Bco2<sup>-/-</sup> Mice. *Arch Biochem Biophys* 716:109111. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109111>
- Li KM, Wilcken DE, Dudman NP (1994) Effect of serum lipoprotein(a) on estimation of low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald formula. *Clinical Chemistry* 40:571–573. <https://doi.org/10.1093/clinchem/40.4.571>
- Li Q, Guan X, Wu P, et al (2020) Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *New England Journal of Medicine* 382:1199–1207.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

Li Y, Dong J-B, Wu M-P (2008) Human ApoA-I overexpression diminishes LPS-induced systemic inflammation and multiple organ damage in mice. *European Journal of Pharmacology* 590:417–422.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.06.047>

Libby P, Buring JE, Badimon L, et al (2019) Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5:56.

<https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

Lindgren FT, Elliott HA, Gofman JW (1951) The Ultracentrifugal Characterization and Isolation of Human Blood Lipids and Lipoproteins, with Applications to the Study of Atherosclerosis. *J Phys Chem* 55:80–93. <https://doi.org/10.1021/j150484a010>

Linke RP, Sipe JD, Pollock PS, et al (1975) Isolation of a low-molecular-weight serum component antigenically related to an amyloid fibril protein of unknown origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1473–1476

Liu D, Ji L, Zhao M, et al (2018) Lysine glycation of apolipoprotein A-I impairs its anti-inflammatory function in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 122:47–57.

<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.08.001>

Lorenzi I, Von Eckardstein A, Radosavljevic S, Rohrer L (2008) Lipidation of apolipoprotein A-I by ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 generates an interaction partner for ABCG1 but not for scavenger receptor BI. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1781:306–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2008.04.006>

Lounila J, Ala-Korpela M, Jokisaari J, et al (1994) Effects of orientational order and particle size on the NMR line positions of lipoproteins. *Phys Rev Lett* 72:4049–4052.

<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.72.4049>

Lu S, Yao Y, Cheng X, et al (2006) Overexpression of apolipoprotein A-IV enhances lipid secretion in IPEC-1 cells by increasing chylomicron size. *J Biol Chem* 281:3473–3483.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M502501200>

Lusa S, Jauhiainen M, Metso J, et al (1996) The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. *Biochemical Journal* 313:275–282. <https://doi.org/10.1042/bj3130275>

Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233–241. <https://doi.org/10.1038/35025203>

## M

Maceyka M, Spiegel S (2014) Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* 510:58–67. <https://doi.org/10.1038/nature13475>

Mackness B, Beltran-Debon R, Aragonés G, et al (2010) Human tissue distribution of paraoxonases 1 and 2 mRNA. *IUBMB Life* 62:480–482. <https://doi.org/10.1002/iub.347>

Mackness M, Arrol S, Abbott C, Durrington P (1993) Protection of low-density lipoprotein against

oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129–135. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(93\)90183-U](https://doi.org/10.1016/0021-9150(93)90183-U)

Mackness MI, Arrol S, Durrington PN (1991) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Letters* 286:152–154. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80962-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80962-3)

Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN (1997) Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet* 349:851–852. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61755-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61755-2)

Madsen CM, Varbo A, Nordestgaard BG (2017) Extreme high high-density lipoprotein cholesterol is paradoxically associated with high mortality in men and women: two prospective cohort studies. *European Heart Journal* 38:2478–2486. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx163>

Madsen CM, Varbo A, Tybjaerg-Hansen A, et al (2018) U-shaped relationship of HDL and risk of infectious disease: two prospective population-based cohort studies. *European Heart Journal* 39:1181–1190. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx665>

Maeba R, Sawada Y, Shimasaki H, et al (2002) Ethanolamine plasmalogens protect cholesterol-rich liposomal membranes from oxidation caused by free radicals. *Chemistry and Physics of Lipids* 120:145–151. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00101-9](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00101-9)

Maeba R, Ueta N (2003) Ethanolamine plasmalogen and cholesterol reduce the total membrane oxidizability measured by the oxygen uptake method. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 302:265–270. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00157-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00157-8)

Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science* 240:622–630

Mahley RW, Hui DY, Innerarity TL, Beisiegel U (1989) Chylomicron remnant metabolism. Role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. *Arteriosclerosis* 9:114-18

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH (1984) 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 RW, Weisgraber KH, Innerarity TL (1979) Interaction of plasma lipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 575:81–91. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90133-4](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90133-4)

Main LA, Ohnishi T, Yokoyama S (1996) Activation of human plasma cholesteryl ester transfer protein by human apolipoprotein A-IV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1300:17–24. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(95\)00228-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(95)00228-6)

Mann CJ, Yen FT, Grant AM, Bihain BE (1991) Mechanism of plasma cholesteryl ester transfer in hypertriglyceridemia. *J Clin Invest* 88:2059–2066. <https://doi.org/10.1172/JCI115535>

Mantovani A, Garlanda C (2023) Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *N Engl J Med* 388:439–452. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2206346>

Maranhão RC, Carvalho PO, Strunz CC, Pileggi F (2014) Lipoprotein (a): Structure, Pathophysiology and Clinical Implications. *Arq Bras Cardiol* 103:76–84. <https://doi.org/10.5935/abc.20140101>

Marsillach J, Becker JO, Vaisar T, et al (2015) Paraoxonase-3 is depleted from the high density

lipoproteins of autoimmune disease patients with subclinical atherosclerosis. *J Proteome Res* 14:2046–2054. <https://doi.org/10.1021/pr5011586>

Martinez LO, Jacquet S, Esteve J-P, et al (2003) Ectopic  $\beta$ -chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421:75–79. <https://doi.org/10.1038/nature01250>

Martinez LO, Najib S, Perret B, et al (2015) Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 238:89–100. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.11.017>

Martínez-López D, Camafeita E, Cedó L, et al (2019) APOA1 oxidation is associated to dysfunctional high-density lipoproteins in human abdominal aortic aneurysm. *eBioMedicine* 43:43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.012>

Martínez-Salazar B, Holwerda M, Stüdle C, et al (2022) COVID-19 and the Vasculature: Current Aspects and Long-Term Consequences. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10:

Mastorikou M, Mackness B, Liu Y, Mackness M (2008) Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides. *Diabet Med* 25:1049–1055. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02546.x>

Maugeais C, Tietge UJF, Broedl UC, et al (2003) Dose-Dependent Acceleration of High-Density Lipoprotein Catabolism by Endothelial Lipase. *Circulation* 108:2121–2126. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000092889.24713.DC>

Mayer FJ, Binder CJ, Krychtiuk KA, et al (2019) The prognostic value of serum amyloid A for long-term mortality among patients with subclinical carotid atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 49:e13095. <https://doi.org/10.1111/eci.13095>

Mazur A (1946) An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem* 164:271–289

McConathy W, Gesquiere J, Bass H, et al (1992) Inhibition of lipoprotein lipase activity by synthetic peptides of apolipoprotein C-III. *Journal of Lipid Research* 33:995–1003. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41415-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41415-4)

McConathy WJ, Alaupovic P (1973) Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: A new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Letters* 37:178–182. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80453-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80453-3)

McGillicuddy FC, de la Llera Moya M, Hinkle CC, et al (2009) Inflammation Impairs Reverse Cholesterol Transport in vivo. *Circulation* 119:1135–1145. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.810721>

McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2009) The emerging roles of PAF acetylhydrolase. *J Lipid Res* 50:S255–S259. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800024-JLR200>

McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, et al (1987) cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 330:132–137. <https://doi.org/10.1038/330132a0>

Medjeral-Thomas NR, Trolborg A, Hansen AG, et al (2021) Protease inhibitor plasma concentrations associate with COVID-19 infection. *Oxf Open Immunol* 2:iqab014. <https://doi.org/10.1093/oxfimm/iqab014>

Miller NE, Ville AL, Crook D (1985) Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by

high-density lipoprotein in rabbit. *Nature* 314:109–111. <https://doi.org/10.1038/314109a0>

Miyakis S, Giannakopoulos B, Krilis SA (2004) Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease. *Thrombosis Research* 114:335–346. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2004.07.017>

Mochizuki H, Scherer SW, Xi T, et al (1998) Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene* 213:149–157. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00193-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00193-0)

Mughal SA, Park R, Nowak N, et al (2013) Apolipoprotein M can discriminate HNF1A-MODY from Type 1 diabetes. *Diabet Med* 30:246–250. <https://doi.org/10.1111/dme.12066>

Mulya A, Seo J, Brown AL, et al (2010) Apolipoprotein M expression increases the size of nascent pre $\beta$  HDL formed by ATP binding cassette transporter A1. *J Lipid Res* 51:514–524. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002162>

Munroe WH, Phillips ML, Schumaker VN (2015) Excessive centrifugal fields damage high density lipoprotein. *J Lipid Res* 56:1172–1181. <https://doi.org/10.1194/jlr.M058735>

Murakami H, Tanabe J, Tamasawa N, et al (2013) Reduction of paraoxonase-1 activity may contribute the qualitative impairment of HDL particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 99:30–38. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2012.10.022>

Murphy A, Chin-Dusting J, Sviridov D (2009) Reconstituted HDL: a therapy for atherosclerosis and beyond. *Clinical Lipidology* 4:731–739. <https://doi.org/10.2217/clp.09.68>

Murphy AJ, Woollard KJ, Suhartoyo A, et al (2011) Neutrophil Activation Is Attenuated by High-Density Lipoprotein and Apolipoprotein A-I in In Vitro and In Vivo Models of Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31:1333–1341. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.226258>

Murray SC, Gillard BK, Ludtke SJ, Pownall HJ (2016) Direct Measurement of the Structure of Reconstituted High-Density Lipoproteins by Cryo-EM. *Biophysical Journal* 110:810–816. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.028>

## N

Nakaya Y, Schaefer J, Bryan H (1980) ACTIVATION OF HUMAN POST HEPARIN LIPOPROTEIN LIPASE BY APOLIPOPROTEIN H (RZ-GLYCOPROTEIN I). 95:

Nanjee MN, Doran JE, Lerch PG, Miller NE (1999) Acute Effects of Intravenous Infusion of ApoA1/Phosphatidylcholine Discs on Plasma Lipoproteins in Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19:979–989. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.19.4.979>

Navab M, Anantharamaiah G, Reddy ST, Fogelman AM (2006) Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Rev Cardiol* 3:540–547. <https://doi.org/10.1038/ncpcardio0661>

Newman WP, Freedman DS, Voors AW, et al (1986) Relation of Serum Lipoprotein Levels and Systolic Blood Pressure to Early Atherosclerosis. *N Engl J Med* 314:138–144.

<https://doi.org/10.1056/NEJM198601163140302>

Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, et al (2006) Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular Genetics and Metabolism* 89:368–373. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.07.004>

Nicholls SJ, Andrews J, Kastelein JJP, et al (2018a) Effect of Serial Infusions of CER-001, a Pre- $\beta$  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 Cardiol* 3:815. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.2121>

Nicholls SJ, Puri R, Ballantyne CM, et al (2018b) 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* 3:806–814. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.2112>

Nicholls SJ, Uno K, Kataoka Y, Nissen SE (2011) ETC-216 for coronary artery disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 11:387–394. <https://doi.org/10.1517/14712598.2011.557061>

Nichols AlexV, Blanche PJ, Gong EL, et al (1985) Molecular pathways in the transformation of model discoidal lipoprotein complexes induced by lecithin: Cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 834:285–300. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90001-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90001-3)

Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA (1986) Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 128:417–431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)28084-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)28084-2)

Nijstad N, Wiersma H, Gautier T, et al (2009) Scavenger Receptor BI-mediated Selective Uptake Is Required for the Remodeling of High Density Lipoprotein by Endothelial Lipase \*. *Journal of Biological Chemistry* 284:6093–6100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807683200>

Nilsson SK, Heeren J, Olivecrona G, Merkel M (2011) Apolipoprotein A-V; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis* 219:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.019>

Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al (2003) Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA* 290:2292–2300. <https://doi.org/10.1001/jama.290.17.2292>

Nobécourt E, Davies MJ, Brown BE, et al (2007) The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia* 50:643–653. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0574-z>

Nobécourt E, Tabet F, Lambert G, et al (2010) Non-Enzymatic Glycation Impairs the Anti-Inflammatory Properties of Apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:766–772. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.201715>

Noble RP (1968) Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *Journal of Lipid Research* 9:693–700. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42680-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42680-X)

Norum KR, Gjone E (1967) Familial Plasma Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Deficiency Biochemical Study of a New Inborn Error of Metabolism. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 20:231–243. <https://doi.org/10.3109/00365516709076948>



Nowotny K, Jung T, Höhn A, et al (2015) Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* 5:194–222. <https://doi.org/10.3390/biom5010194>



O'Brien KD, Vuletic S, McDonald TO, et al (2003) Cell-Associated and Extracellular Phospholipid Transfer Protein in Human Coronary Atherosclerosis. *Circulation* 108:270–274. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000079163.97653.CD>

O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, et al (2005) The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin Chem* 51:351–359. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.040824>

Ohta T, Fidge NH, Nestel PJ (1985) Studies on the in vivo and in vitro distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma and lymph. *J Clin Invest* 76:1252–1260. <https://doi.org/10.1172/JCI112081>

Oka T, Kujiraoka T, Ito M, et al (2000) Distribution of phospholipid transfer protein in human plasma: presence of two forms of phospholipid transfer protein, one catalytically active and the other inactive. *Journal of Lipid Research* 41:1651–1657. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31998-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31998-2)

Oldoni F, Baldassarre D, Castelnuovo S, et al (2018) Complete and Partial Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Deficiency Is Differentially Associated With Atherosclerosis. *Circulation* 138:1000–1007. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034706>

Oliveira HC, Ma L, Milne R, et al (1997) Cholesteryl ester transfer protein activity enhances plasma cholesteryl ester formation. Studies in CETP transgenic mice and human genetic CETP deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1045–1052. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.6.1045>

Ortega-Paz L, Giordano S, Capodanno D, et al (2023) Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of CSL112. *Clin Pharmacokinet* 62:541–558. <https://doi.org/10.1007/s40262-023-01224-8>

Ortiz-Muñoz G, Houard X, Martín-Ventura J-L, et al (2009) HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *The FASEB Journal* 23:3129–3139. <https://doi.org/10.1096/fj.08-127928>

Osborne JC, Brewer HB (1977) The Plasma Lipoproteins. In: Anfinsen CB, Edsall JT, Richards FM (eds) *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press, pp 253–337

# P

Page NM, Butlin DJ, Lomthaisong K, Lowry PJ (2001) The Human Apolipoprotein L Gene Cluster: Identification, Classification, and Sites of Distribution. *Genomics* 74:71–78. <https://doi.org/10.1006/geno.2001.6534>

Pajkrt D, Doran JE, Koster F, et al (1996) Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *The Journal of experimental medicine* 184:1601–1608. <https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1601>

Parker TS, Levine DM, Chang JC, et al (1995) Reconstituted high-density lipoprotein neutralizes gram-negative bacterial lipopolysaccharides in human whole blood. *Infect Immun* 63:253–258

Passarelli M, Tang C, McDonald TO, et al (2005) Advanced Glycation End Product Precursors Impair ABCA1-Dependent Cholesterol Removal From Cells. *Diabetes* 54:2198–2205. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.7.2198>

Patsch JR, Gotto AM, Olivercrona T, Eisenberg S (1978) Formation of high density lipoprotein<sub>2</sub>-like particles during lipolysis of very low density lipoproteins in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:4519–4523. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4519>

Pattnaik NM, Zilversmit DB (1979) Interaction of cholesteryl ester exchange protein with human plasma lipoproteins and phospholipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 254:2782–2786. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)30141-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)30141-2)

Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al (2001) An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294:169–173. <https://doi.org/10.1126/science.1064852>

Pepino MY, Kuda O, Samovski D, Abumrad NA (2014) Structure-Function of CD36 and Importance of Fatty Acid Signal Transduction in Fat Metabolism. *Annu Rev Nutr* 34:281–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161220>

Pereira RM, Mekary RA, Da Cruz Rodrigues KC, et al (2018) Protective molecular mechanisms of clusterin against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev* 23:123–129. <https://doi.org/10.1007/s10741-017-9654-z>

Perségol L, Darabi M, Dauteuille C, et al (2018) Small dense HDLs display potent vasorelaxing activity, reflecting their elevated content of sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* 59:25–34. <https://doi.org/10.1194/jlr.M076927>

Pertzov B, Shapira G, Abushkara S, et al (2022) Lower serum alpha 1 antitrypsin levels in patients with severe COVID-19 compared with patients hospitalized due to non-COVID-19 pneumonia. *Infectious Diseases* 54:846–851. <https://doi.org/10.1080/23744235.2022.2111464>

Phillips MC (2018) Is ABCA1 a lipid transfer protein? *J Lipid Res* 59:749–763. <https://doi.org/10.1194/jlr.R082313>

Pirillo A, Catapano AL, Norata GD (2015) HDL in Infectious Diseases and Sepsis. In: High Density Lipoproteins. Springer International Publishing, pp 483–508

Polz E, Kostner GM (1979) The binding of  $\beta$ 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins. FEBS Letters 102:183–186. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80955-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80955-2)

Polz E, Kostner GM, Holasek A (1979) Studies on the Protein Composition of Human Serum Very Low Density Lipoproteins: Demonstration of the  $\beta$ 2-Glycoprotein-I. 360:1061–1068. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1979.360.2.1061>

Preissner KT, Grulich-Henn J, Ehrlich HJ, et al (1990) Structural requirements for the extracellular interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with endothelial cell matrix-associated vitronectin. Journal of Biological Chemistry 265:18490–18498. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44778-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44778-8)

Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN (1996) The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. Genomics 33:498–507. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0225>

Pu LJ, Lu L, Zhang RY, et al (2013) Glycation of Apoprotein A-I Is Associated With Coronary Artery Plaque Progression in Type 2 Diabetic Patients. Diabetes Care 36:1312–1320. <https://doi.org/10.2337/dc12-1411>

## Q

Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, et al (1998) Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. Am J Physiol 274:H1836-1840. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.5.H1836>

## R

Rader DJ (2006) Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. J Clin Invest 116:3090–3100. <https://doi.org/10.1172/JCI30163>

Radojkovic C, Genoux A, Pons V, et al (2009) Stimulation of Cell Surface F1-ATPase Activity by Apolipoprotein A-I Inhibits Endothelial Cell Apoptosis and Promotes Proliferation. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 29:1125–1130. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.187997>

Rani A, Marsche G (2023) A Current Update on the Role of HDL-Based Nanomedicine in Targeting Macrophages in Cardiovascular Disease. Pharmaceuticals 15:1504. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051504>

Rashid S, Watanabe T, Sakaue T, Lewis GF (2003) Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemic states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. Clinical Biochemistry 36:421–429. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(03\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(03)00078-X)

Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, et al (2000) Apolipoprotein D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482:185–198. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00162-X)

Recalde D, Ostos MA, Badell E, et al (2004) Human Apolipoprotein A-IV Reduces Secretion of Proinflammatory Cytokines and Atherosclerotic Effects of a Chronic Infection Mimicked by Lipopolysaccharide. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24:756–761. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000119353.03690.22>

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, et al (2001) Human Paraoxonase-3 Is an HDL-Associated Enzyme With Biological Activity Similar to Paraoxonase-1 Protein but Is Not Regulated by Oxidized Lipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 21:542–547. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.21.4.542>

Reisinger AC, Schuller M, Holzer M, et al (2020) Arylesterase Activity of HDL Associated Paraoxonase as a Potential Prognostic Marker in Patients With Sepsis and Septic Shock—A Prospective Pilot Study. *Front Med* 7:579677. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.579677>

Reisinger AC, Schuller M, Sourij H, et al (2022) Impact of Sepsis on High-Density Lipoprotein Metabolism. *Front Cell Dev Biol* 9:795460. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.795460>

Remaley AT, Stonik JA, Demosky SJ, et al (2001) Apolipoprotein Specificity for Lipid Efflux by the Human ABCA1 Transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280:818–823. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4219>

Reyes-Soffer G, Ginsberg HN, Berglund L, et al (2022) Lipoprotein(a): A Genetically Determined, Causal, and Prevalent Risk Factor for Atherosclerotic Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 42:e48–e60. <https://doi.org/10.1161/ATV.000000000000147>

Ricklin D, Reis ES, Mastellos DC, et al (2016) Complement component C3 - The “Swiss Army Knife” of innate immunity and host defense. *Immunol Rev* 274:33–58. <https://doi.org/10.1111/imr.12500>

Rizzo M, Pernice V, Frasheri A, et al (2009) Small, dense low-density lipoproteins (LDL) are predictors of cardio- and cerebro-vascular events in subjects with the metabolic syndrome. *Clinical Endocrinology* 70:870–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03407.x>

Robbesyn F, Garcia V, Auge N, et al (2003) HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 17:743–745. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0240fje>

Rouhani N, Young E, Chatterjee C, Sparks DL (2008) HDL Composition Regulates Displacement of Cell Surface-Bound Hepatic Lipase. *Lipids* 43:793–804. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3214-1>

Ruiz M, Okada H, Dahlbäck B (2017) HDL-associated ApoM is anti-apoptotic by delivering sphingosine 1-phosphate to S1P1 & S1P3 receptors on vascular endothelium. *Lipids in Health and Disease* 16:36. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0429-2>

Rust S, Rosier M, Funke H, et al (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22:352–355. <https://doi.org/10.1038/11921>

Rustaeus S, Lindberg K, Stillemark P, et al (1999) Assembly of very low density lipoprotein: a two-step process of apolipoprotein B core lipidation. *J Nutr* 129:463S-466S. <https://doi.org/10.1093/jn/129.2.463S>

Rye K-A, Bursill CA, Lambert G, et al (2009) The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res* 50:S195–S200. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800034-JLR200>

Rye K-A, Hime NJ, Barter PJ (1995) The Influence of Cholesteryl Ester Transfer Protein on the Composition, Size, and Structure of Spherical, Reconstituted High Density Lipoproteins (\*). *Journal of Biological Chemistry* 270:189–196. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.1.189>

Rye K-A, Hime NJ, Barter PJ (1996) The Influence of Sphingomyelin on the Structure and Function of Reconstituted High Density Lipoproteins (\*). *Journal of Biological Chemistry* 271:4243–4250. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.8.4243>

## S

Sarma JV, Ward PA (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* 343:227–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1034-0>

Sattler K, Levkau B (2009) Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovascular Research* 82:201–211. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp070>

Schaloske RH, Dennis EA (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761:1246–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2006.07.011>

Scherer M, Böttcher A, Schmitz G, Liebisch G (2011) Sphingolipid profiling of human plasma and FPLC-separated lipoprotein fractions by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811:68–75. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2010.11.003>

Schroeder WT, Miller MF, Woo SL, Saunders GF (1985) Chromosomal localization of the human alpha 1-antitrypsin gene (PI) to 14q31-32. *Am J Hum Genet* 37:868–872

Schuchardt M, Prüfer N, Tu Y, et al (2019) Dysfunctional high-density lipoprotein activates toll-like receptors via serum amyloid A in vascular smooth muscle cells. *Sci Rep* 9:3421. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39846-3>

Schumaker VN, Puppione DL (1986) [6] Sequential flotation ultracentrifugation. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp 155–170

Schvartz I, Seger D, Shaltiel S (1999) Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 31:539–544. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99)00005-9)

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, et al (1999) Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2\*. *Journal of Biological Chemistry* 274:17406–17409.

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17406>

Schwarzenbacher R, Zeth K, Diederichs K, et al (1999) Crystal structure of human beta2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J* 18:6228–6239. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6228>

Sehayek E, Eisenberg S (1991) Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich lipoproteins through the low density lipoprotein receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry* 266:18259–18267. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55263-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55263-7)

Settasatian N, Duong M, Curtiss LK, et al (2001) The Mechanism of the Remodeling of High Density Lipoproteins by Phospholipid Transfer Protein \*. *Journal of Biological Chemistry* 276:26898–26905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010708200>

Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al (1998) Effects of Recombinant Apolipoprotein A-IMilano on Aortic Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation* 97:780–785. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.97.8.780>

Shao B, Cavigiolio G, Brot N, et al (2008) Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:12224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802025105>

Sharma NK, Ferreira BL, Tashima AK, et al (2019) Lipid metabolism impairment in patients with sepsis secondary to hospital acquired pneumonia, a proteomic analysis. *Clin Proteomics* 16:29. <https://doi.org/10.1186/s12014-019-9252-2>

Sharma NK, Tashima AK, Brunialti MKC, et al (2017) Proteomic study revealed cellular assembly and lipid metabolism dysregulation in sepsis secondary to community-acquired pneumonia. *Sci Rep* 7:15606. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15755-1>

Shen W-J, Azhar S, Kraemer FB (2018) SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol* 80:95–116. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121550>

Shen Y, Lookene A, Zhang L, Olivecrona G (2010) Site-directed Mutagenesis of Apolipoprotein CII to Probe the Role of Its Secondary Structure for Activation of Lipoprotein Lipase \*. *Journal of Biological Chemistry* 285:7484–7492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.022046>

Shih DM, Gu L, Xia Y-R, et al (1998) Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394:284–287. <https://doi.org/10.1038/28406>

Shore VG, Shore B (1973) Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins. Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12:502–507. <https://doi.org/10.1021/bi00727a022>

Sirwi A, Hussain MM (2018) Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins. *Journal of Lipid Research* 59:1094–1102. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083451>

Siwy J, Wendt R, Albalat A, et al (2021) CD99 and polymeric immunoglobulin receptor peptides deregulation in critical COVID-19: A potential link to molecular pathophysiology? *Proteomics* 21:e2100133. <https://doi.org/10.1002/pmic.202100133>

Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS (1990) Identification of nucleotides responsible for

enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 265:2306–2310. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39976-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39976-4)

Soutar AK, Garner CW, Baker HN, et al (1975) Effect of the human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on the activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry* 14:3057–3064. <https://doi.org/10.1021/bi00685a003>

Stangl H, Hyatt M, Hobbs HH (1999) Transport of Lipids from High and Low Density Lipoproteins via Scavenger Receptor-BI \*. *Journal of Biological Chemistry* 274:32692–32698. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32692>

Stanley MM, Pineda EP, Cheng SH (1959) Serum Cholesterol Esters and Intestinal Cholesterol Secretion and Absorption in Obstructive Jaundice Due to Cancer. *N Engl J Med* 261:368–373. <https://doi.org/10.1056/NEJM195908202610802>

Stasi A, Fiorentino M, Franzin R, et al (2023) Beneficial effects of recombinant CER-001 high-density lipoprotein infusion in sepsis: results from a bench to bedside translational research project. *BMC Medicine* 21:392. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03057-5>

Steel DM, Sellar GC, Uhlar CM, et al (1993) A Constitutively Expressed Serum Amyloid A Protein Gene (SAA4) Is Closely Linked to, and Shares Structural Similarities with, an Acute-Phase Serum Amyloid A Protein Gene (SAA2). *Genomics* 16:447–454. <https://doi.org/10.1006/geno.1993.1209>

Steinmetz A, Utermann G (1985) Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *Journal of Biological Chemistry* 260:2258–2264. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)89547-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)89547-3)

Stillemark-Billton P, Beck C, Borén J, Olofsson S-O (2005) Relation of the size and intracellular sorting of apoB to the formation of VLDL 1 and VLDL 2. *Journal of Lipid Research* 46:104–114. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400296-JLR200>

Stocker R, Keaney JF (2004) Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews* 84:1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>

Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, et al (2008) Severe Bile Salt Export Pump Deficiency: 82 Different ABCB11 Mutations in 109 Families. *Gastroenterology* 134:1203-1214.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.038>

Stremler KE, Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM (1991) Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates. *Journal of Biological Chemistry* 266:11095–11103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99132-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99132-5)

Subbaiah PV, Albers JJ, Chen CH, Bagdade JD (1980) Low density lipoprotein-activated lysolecithin acylation by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. Identity of lysolecithin acyltransferase and lecithin-cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 255:9275–9280. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)70558-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)70558-4)

Subramanian VS, Goyal J, Miwa M, et al (1999) Role of lecithin-cholesterol acyltransferase in the metabolism of oxidized phospholipids in plasma: studies with platelet-activating factor-acetyl hydrolase-deficient plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1439:95–109. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00072-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00072-4)

Suc I, Escargueil-Blanc I, Troly M, et al (1997) HDL and ApoA Prevent Cell Death of Endothelial Cells Induced by Oxidized LDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17:2158–2166. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.17.10.2158>

Sun H-Y, Chen S-F, Lai M-D, et al (2010) Comparative proteomic profiling of plasma very-low-density and low-density lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 411:336–344. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.11.023>

Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, et al (2010) HDL suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation* 122:1919–1927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961193>

## T

Tabet F, Remaley AT, Segaliny AI, et al (2010) The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:246–252. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.200196>

Taha TA, Mullen TD, Obeid LM (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 1758:2027–2036. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.018>

Tall AR, Krumholz S, Olivecrona T, Deckelbaum RJ (1985) Plasma phospholipid transfer protein enhances transfer and exchange of phospholipids between very low density lipoproteins and high density lipoproteins during lipolysis. *J Lipid Res* 26:842–851

Tall AR, Rader DJ (2018) Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circulation Research* 122:106–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311978>

Tanaka S, Diallo D, Delbosc S, et al (2019) High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients. *Ann Intensive Care* 9:68. <https://doi.org/10.1186/s13613-019-0541-8>

Tanaka S, Genève C, Zappella N, et al (2020a) Reconstituted High-density Lipoprotein Therapy Improves Survival in Mouse Models of Sepsis: *Anesthesiology* 132:825–838. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003155>

Tanaka S, Tymowski CD, Assadi M, et al (2020b) Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLOS ONE* 15:e0239573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239573>

Tanaka S, Tymowski CD, Assadi M, et al (2020c) Lipoprotein concentrations over time in the intensive care unit COVID-19 patients: Results from the ApoCOVID study. *PLOS ONE* 15:e0239573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239573>

Tardif J-C (2007) Effects of Reconstituted High-Density Lipoprotein Infusions on Coronary Atherosclerosis: A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 297:1675.



<https://doi.org/10.1001/jama.297.15.jpc70004>

Tardif J-C, Ballantyne CM, Barter P, et al (2014) Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur Heart J* 35:3277–3286. <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* 4:32–34. <https://doi.org/10.15420/usc.2007.4.2.32>

Tardy C, Goffinet M, Boubekeur N, et al (2014) CER-001, a HDL-mimetic, stimulates the reverse lipid transport and atherosclerosis regression in high cholesterol diet-fed LDL-receptor deficient mice. *Atherosclerosis* 232:110–118. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.018>

Tardy C, Goffinet M, Boubekeur N, et al (2015) HDL and CER-001 Inverse-Dose Dependent Inhibition of Atherosclerotic Plaque Formation in apoE<sup>-/-</sup> Mice: Evidence of ABCA1 Down-Regulation. *PLoS One* 10:e0137584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137584>

Terasaka N, Yu S, Yvan-Charvet L, et al (2008) ABCG1 and HDL protect against endothelial dysfunction in mice fed a high-cholesterol diet. *J Clin Invest* 118:3701–3713. <https://doi.org/10.1172/JCI35470>

Teuwen L-A, Geldhof V, Pasut A, Carmeliet P (2020) COVID-19: the vasculature unleashed. *Nature Reviews Immunology* 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0343-0>

Thandassery RB, Dranoff JA, Perisetti A, Taddei T (2022) COVID-19 and the liver: a narrative review of the present state of knowledge. *Transl Gastroenterol Hepatol* 7:40. <https://doi.org/10.21037/tgh-20-243>

Tiwari S, Siddiqi SA (2012) Intracellular Trafficking and Secretion of VLDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32:1079–1086. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241471>

Tollefson JH, Ravnik S, Albers JJ (1988) Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. *Journal of Lipid Research* 29:1593–1602. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38404-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38404-2)

Tricoci P, D'Andrea DM, Gurbel PA, et al (2015) Infusion of Reconstituted High-Density Lipoprotein, CSL112, in Patients With Atherosclerosis: Safety and Pharmacokinetic Results From a Phase 2a Randomized Clinical Trial. *JAMA* 314:2171–2181. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002171>

Trinder M, Genga KR, Kong HJ, et al (2019) Cholesteryl Ester Transfer Protein Influences High-Density Lipoprotein Levels and Survival in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 199:854–862. <https://doi.org/10.1164/rccm.201806-1157OC>

Trinder M, Walley KR, Boyd JH, Brunham LR (2020) Causal Inference for Genetically Determined Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol and Risk of Infectious Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 40:267–278. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313381>

Trinder M, Wang Y, Madsen CM, et al (2021) Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein Preserves High-Density Lipoprotein Cholesterol and Improves Survival in Sepsis. *Circulation* 143:921–934. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048568>

Tso P, Balint JA (1986) Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 250:G715–G726. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1986.250.6.G715>

Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, et al (2010) HDL biogenesis and functions: Role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 208:3–9. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.034>

## U

Uhlar CM, Whitehead AS (1999) Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *European Journal of Biochemistry* 265:501–523. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00657.x>

Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>

Ulloque-Badaracco JR, Hernandez-Bustamante EA, Herrera-Añazco P, Benites-Zapata VA (2021) Prognostic value of apolipoproteins in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease* 44:102200. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2021.102200>

Ulrich V, Konanah ES, Herz J, et al (2014) Genetic variants of ApoE and ApoER2 differentially modulate endothelial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111:13493–13498. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402106111>

Utermann G (1989) The mysteries of lipoprotein(a). *Science* 246:904–910. <https://doi.org/10.1126/science.2530631>

Utermann G (1987) Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *American Heart Journal* 113:433–440. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(87\)90610-7](https://doi.org/10.1016/0002-8703(87)90610-7)

## V

Vaisar T, Pennathur S, Green PS, et al (2007) Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest* 117:746–756. <https://doi.org/10.1172/JCI26206>

Van Leeuwen HJ, Heezius ECJM, Dallinga GM, et al (2003) Lipoprotein metabolism in patients with severe sepsis: *Critical Care Medicine* 31:1359–1366. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000059724.08290.51>

Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, et al (2001) The Role of High-Density Lipoproteins in Oxidation and Inflammation. *Trends in Cardiovascular Medicine* 11:155–161. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(01\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(01)00095-0)

Vanhollebeke B, Nielsen MJ, Watanabe Y, et al (2007) Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:4118–4123. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609902104>

Vaninov N (2020) In the eye of the COVID-19 cytokine storm. *Nat Rev Immunol* 20:277–277. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0305-6>

Varban ML, Rinninger F, Wang N, et al (1998) Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:4619–4624. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4619>

Vélez-Carrasco W, Lichtenstein AH, Barrett PH, et al (1999) Human apolipoprotein A-I kinetics within triglyceride-rich lipoproteins and high density lipoproteins. *J Lipid Res* 40:1695–1700

Vickers KC, Michell DL (2021) HDL-small RNA Export, Transport, and Functional Delivery in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 23:38. <https://doi.org/10.1007/s11883-021-00930-7>

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al (2011) MicroRNAs are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13:423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>

Vikstedt R, Metso J, Hakala J, et al (2007) Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells Is Enhanced by Active Phospholipid Transfer Protein through Generation of Two Types of Acceptor Particles. *Biochemistry* 46:11979–11986. <https://doi.org/10.1021/bi700833h>

Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, et al (2021) 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Developed by the Task Force for cardiovascular disease prevention in clinical practice with representatives of the European Society of Cardiology and 12 medical societies With the special contribution of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC). *European Heart Journal* 42:3227–3337. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab484>

Vuletic S, Jin L-W, Marcovina SM, et al (2003) Widespread distribution of PLTP in human CNS: evidence for PLTP synthesis by glia and neurons, and increased levels in Alzheimer’s disease. *Journal of Lipid Research* 44:1113–1123. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300046-JLR200>

## W

Walldius G, Jungner I (2004) Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *Journal of Internal Medicine* 255:188–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01276.x>

Wan G, Zhaorigetu S, Liu Z, et al (2008) Apolipoprotein L1, a Novel Bcl-2 Homology Domain 3-only Lipid-binding Protein, Induces Autophagic Cell Death \*. *Journal of Biological Chemistry* 283:21540–21549. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800214200>

Wang G, Zhang Q, Zhao X, et al (2020) Low high-density lipoprotein level is correlated with the severity of COVID-19 patients: an observational study. *Lipids Health Dis* 19:1–7. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01382-9>

Wang J, Burnett JR, Near S, et al (2000a) Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1983–1989. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.8.1983>

Wang L, Chen W-Z, Wu M-P (2010) Apolipoprotein A-I inhibits chemotaxis, adhesion, activation of THP-1 cells and improves the plasma HDL inflammatory index. *Cytokine* 49:194–200. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.08.008>

Wang L, Dudek SM (2009) Regulation of Vascular Permeability by Sphingosine 1-Phosphate. *Microvasc Res* 77:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2008.09.005>

Wang N, Lan D, Chen W, et al (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9774–9779. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403506101>

Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, et al (2006) LXR-Induced Redistribution of ABCG1 to Plasma Membrane in Macrophages Enhances Cholesterol Mass Efflux to HDL. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26:1310–1316. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000218998.75963.02>

Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR (2000b) Specific Binding of ApoA-I, Enhanced Cholesterol Efflux, and Altered Plasma Membrane Morphology in Cells Expressing ABC1 \*. *Journal of Biological Chemistry* 275:33053–33058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005438200>

Warden CH, Langner CA, Gordon JL, et al (1989) Tissue-Specific Expression, Developmental Regulation, and Chromosomal Mapping of the Lecithin: Cholesterol Acyltransferase Gene. *Journal of Biological Chemistry* 264:21573–21581. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)88222-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)88222-2)

Watson AD, Navab M, Hama SY, et al (1995) Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 95:774–782. <https://doi.org/10.1172/JCI117726>

Webb NR (2021) High-Density Lipoproteins and Serum Amyloid A (SAA). *Curr Atheroscler Rep* 23:7. <https://doi.org/10.1007/s11883-020-00901-4>

Wei X, Zeng W, Su J, et al (2020) Hypolipidemia is associated with the severity of COVID-19. *Journal of Clinical Lipidology* 14:297–304. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.04.008>

Weinberg RB, Gallagher JW, Fabritius MA, Shelness GS (2012) ApoA-IV modulates the secretory trafficking of apoB and the size of triglyceride-rich lipoproteins. *J Lipid Res* 53:736–743. <https://doi.org/10.1194/jlr.M019992>

Weisgraber KH (1994) Apolipoprotein E: Structure-Function Relationships. In: *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, pp 249–302

Weisgraber KH, Mahley RW, Kowal RC, et al (1990) Apolipoprotein C-I modulates the interaction of apolipoprotein E with beta-migrating very low density lipoproteins (beta-VLDL) and inhibits binding of beta-VLDL to low density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Biological Chemistry* 265:22453–22459. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45726-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45726-2)

Weisgraber KH, Rall SC, Bersot TP, et al (1983) Apolipoprotein A-IMilano. Detection of normal A-I in affected subjects and evidence for a cysteine for arginine substitution in the variant A-I. *Journal of Biological Chemistry* 258:2508–2513. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32955-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32955-7)

Wendel M, Paul R, Heller AR (2007) Lipoproteins in inflammation and sepsis. II. Clinical aspects. *Intensive Care Med* 33:25–35. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0433-x>

Whitehead AS, De Beer MC, Steel DM, et al (1992) Identification of novel members of the serum amyloid

A protein superfamily as constitutive apolipoproteins of high density lipoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 267:3862–3867. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50605-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50605-6)

Wicken AJ, Knox KW (1975) Lipoteichoic Acids: A New Class of Bacterial Antigen: Membrane lipoteichoic acids can function as surface antigens of gram-positive bacteria. *Science* 187:1161–1167. <https://doi.org/10.1126/science.46620>

Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, et al (2009) Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Lipid Research* 50:574–585. <https://doi.org/10.1194/jlr.D800028-JLR200>

Wilson PG, Thompson JC, Shridas P, et al (2018) Serum Amyloid A Is an Exchangeable Apolipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38:1890–1900. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310979>

Wilson PW, Abbott RD, Castelli WP (1988) High density lipoprotein cholesterol and mortality. The Framingham Heart Study. *Arteriosclerosis* 8:737–741. <https://doi.org/10.1161/01.atv.8.6.737>

Wolfrum C, Poy MN, Stoffel M (2005) Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med* 11:418–422. <https://doi.org/10.1038/nm1211>

Wu BJ, Chen K, Shrestha S, et al (2013) High-Density Lipoproteins Inhibit Vascular Endothelial Inflammation by Increasing 3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta$ 24 Reductase Expression and Inducing Heme Oxygenase-1. *Circulation Research* 112:278–288. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300104>

Wurfel MM, Hailman E, Wright SD (1995) Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 181:1743–1754. <https://doi.org/10.1084/jem.181.5.1743>

Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, et al (1994) Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *The Journal of experimental medicine* 180:1025–1035. <https://doi.org/10.1084/jem.180.3.1025>

Wyatt AR, Yerbury JJ, Berghofer P, et al (2011) Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cell Mol Life Sci* 68:3919–3931. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0684-8>

# X

Xiao C, Stahel P, Lewis GF (2019) Regulation of Chylomicron Secretion: Focus on Post-Assembly Mechanisms. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 7:487–501. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.015>

Xu N, Dahlbäck B (1999) A Novel Human Apolipoprotein (apoM) \*. *Journal of Biological Chemistry* 274:31286–31290. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.44.31286>

Xu N, Zhang X-Y, Dong X, et al (2002) Effects of Platelet-Activating Factor, Tumor Necrosis Factor, and Interleukin-1 $\alpha$  on the Expression of Apolipoprotein M in HepG2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 292:944–950. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6755>

Xu S, Ilyas I, Weng J (2023) Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. *Acta Pharmacol Sin* 44:695–709. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00998-0>

# Y

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, et al (2019) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol* 15:501–518. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>

Yang Y, Shen C, Li J, et al (2020) Exuberant elevation of IP-10, MCP-3 and IL-1 $\alpha$  during SARS-CoV-2 infection is associated with disease severity and fatal outcome

Yao Mattisson I, Christoffersen C (2021) Apolipoprotein M and its impact on endothelial dysfunction and inflammation in the cardiovascular system. *Atherosclerosis* 334:76–84. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.08.039>

Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A, et al (2010) Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res* 51:2341–2351. <https://doi.org/10.1194/jlr.M006494>

Young SG (1990) Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation* 82:1574–1594. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.5.1574>

Younis N, Charlton-Menys V, Sharma R, et al (2009) Glycation of LDL in non-diabetic people: Small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis* 202:162–168. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.04.036>

Yu L, Gupta S, Xu F, et al (2005) Expression of ABCG5 and ABCG8 Is Required for Regulation of Biliary Cholesterol Secretion\*. *Journal of Biological Chemistry* 280:8742–8747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411080200>

Yue J, Xu H, Zhou Y, et al (2021) Dyslipidemia Is Related to Mortality in Critical Patients With Coronavirus Disease 2019: A Retrospective Study. *Frontiers in Endocrinology* 12:618. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.611526>

Yvan-Charvet L, Pagler TA, Seimon TA, et al (2010) ABCA1 and ABCG1 Protect Against Oxidative Stress-Induced Macrophage Apoptosis During Efferocytosis. *Circ Res* 106:1861–1869. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217281>

## Z

Zalewski A, Macphee C (2005) Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25:923–931. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000160551.21962.a7>

Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, et al (1985) Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. *Biochemistry* 24:4450–4455. <https://doi.org/10.1021/bi00337a028>

Zerrad-Saadi A, Therond P, Chantepie S, et al (2009) HDL3-Mediated Inactivation of LDL-Associated Phospholipid Hydroperoxides Is Determined by the Redox Status of Apolipoprotein A-I and HDL Particle Surface Lipid Rigidity: Relevance to Inflammation and Atherogenesis. *ATVB* 29:2169–2175. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.194555>

Zhang B, Lu Y, Campbell-Thompson M, et al (2007)  $\alpha$ 1-Antitrypsin Protects  $\beta$ -Cells From Apoptosis. *Diabetes* 56:1316–1323. <https://doi.org/10.2337/db06-1273>

Zhang L, Yan F, Zhang S, et al (2012) Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nature chemical biology* 8:342. <https://doi.org/10.1038/nchembio.796>

Zhang X, Tan Y, Ling Y, et al (2020) Viral and host factors related to the clinical outcome of COVID-19. *Nature* 583:437–440. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2355-0>

Zheng KH, Kaiser Y, Van Olden CC, et al (2020) No benefit of HDL mimetic CER-001 on carotid atherosclerosis in patients with genetically determined very low HDL levels. *Atherosclerosis* 311:13–19. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.08.004>

Zheng Z, Zeng Y, Zhu X, et al (2019) ApoM-S1P Modulates Ox-LDL-Induced Inflammation Through the PI3K/Akt Signaling Pathway in HUVECs. *Inflammation* 42:606–617. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0918-0>

Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, et al (2003) How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Mol Biol* 10:541–544. <https://doi.org/10.1038/nsb943>

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579:270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu N, Zhang D, Wang W, et al (2020) A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 382:727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

Zinellu A, Paliogiannis P, Fois AG, et al (2021) Cholesterol and Triglyceride Concentrations, COVID-19 Severity, and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis With Meta-Regression. *Frontiers in Public Health* 9:

Zwartjes MSZ, Gerdes VEA, Nieuwdorp M (2021) The Role of Gut Microbiota and Its Produced Metabolites in Obesity, Dyslipidemia, Adipocyte Dysfunction, and Its Interventions. *Metabolites* 11:531. <https://doi.org/10.3390/metabo11080531>





# **TRAVAUX COLLABORATIFS**





Article

# *Antirhea borbonica* Aqueous Extract Protects Albumin and Erythrocytes from Glycoxidative Damages

Jade Delveaux<sup>1,†</sup>, Chloé Turpin<sup>1,†</sup>, Bryan Veeren<sup>1</sup>, Nicolas Diotel<sup>1</sup>, Susana B. Bravo<sup>2</sup> , Floran Begue<sup>1</sup>, Ezequiel Álvarez<sup>2,3</sup> , Olivier Meilhac<sup>1,4</sup>, Emmanuel Bourdon<sup>1,\*</sup> and Philippe Rondeau<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTRO), 97400 Saint-Denis de La Réunion, France; jade.delveaux@gmail.com (J.D.); tur.chloe@gmail.com (C.T.); veeren.b@hotmail.fr (B.V.); nicolas.diotel@univ-reunion.fr (N.D.); begue.floran@hotmail.fr (F.B.); olivier.meilhac@inserm.fr (O.M.)

<sup>2</sup> Proteomic Unit and Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), SERGAS, 15706 Santiago de Compostela, Spain; sbbravo@gmail.com (S.B.B.); ezequiel.alvarez.castro@gmail.com (E.Á.)

<sup>3</sup> CIBERCV, 28029 Madrid, Spain

<sup>4</sup> Centre hospitalier universitaire de La Réunion, 97400 Saint Denis, France

\* Correspondence: emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr (E.B.); rophil@univ-reunion.fr (P.R.); Tel.: +262(0)-2-62-93-88-43 (P.R.); Fax: +262(0)-2-62-93-88-01 (P.R.)

† Both authors contributed equally to this work.

Received: 30 March 2020; Accepted: 9 May 2020; Published: 12 May 2020



**Abstract:** Diabetes constitutes a major health problem associated with severe complications. In hyperglycemic conditions, chronically increased oxidation and glycation of circulating components lead to advanced glycation end-products (AGEs) formation, a key contributor in diabetes complication progression. In line with literature documenting the beneficial properties of herbal teas, this study evaluates the antioxidant/glycant properties of *Antirhea borbonica* (*Ab*). *Ab* aqueous extract effects were tested on human albumin or erythrocytes submitted to methyl glyoxal-mediated glycoxidative damages. By using mass spectrometry, *Ab* aqueous extracts revealed to be rich in polyphenols. All tested biomarkers of oxidation and glycation, such as AGE, ketoamine, oxidized thiol groups, were decreased in albumin when glycated in the presence of *Ab* aqueous extract. *Ab* extract preserve erythrocyte from methylglyoxal (MGO)-induced damages in terms of restored membrane deformability, reduced oxidative stress and eryptosis phenomenon. Antioxidant capacities of *Ab* extract on erythrocytes were retrieved in vivo in zebrafish previously infused with MGO. These results bring new evidences on the deleterious impacts of glycation on albumin and erythrocyte in diabetes. Furthermore, it reveals antioxidant and antiglycant properties of *Ab* that could be used for the dietary modulation of oxidative stress and glycation in hyperglycemic situations.

**Keywords:** *Antirhea borbonica*; albumin; erythrocytes; diabetes; glycation; antioxidant; oxidative stress; zebrafish

## 1. Introduction

Diabetes pathology is associated with hyperglycemia and an enhanced risk of developing cardiovascular disease [1]. Several metabolic and signaling pathways become dysfunctional and contribute to chronic disorders associated with diabetes. For instance, oxidative stress and glycation leading to advanced glycation end-products (AGEs) formation, were identified as key mediators of multiple complications occurring in diabetes [2]. The generation of AGEs results from a complex process,



Brief Report

# Zika E Glycan Loop Region and Guillain–Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development

Grégoire Lebeau <sup>1,†</sup>, Etienne Frumence <sup>1,†</sup>, Jonathan Turpin <sup>1</sup>, Florian Begue <sup>2</sup>, Jean-Jacques Hoarau <sup>1</sup>, Gilles Gadea <sup>1</sup>, Pascale Krejbich-Trotot <sup>1</sup>, Philippe Desprès <sup>1</sup> and Wildriss Viranaicken <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Processus Infectieux en Milieu Insulaire et Tropical (PIMIT), Université de La Réunion 1, La Réunion, 97490 Sainte-Clotilde, France; greg.lebeau@live.fr (G.L.); Etienne.frum@gmail.com (E.F.); jonathan.turpin@univ-reunion.fr (J.T.); jean-jacques.hoarau@univ-reunion.fr (J.-J.H.); gilles.gadea@inserm.fr (G.G.); pascale.krebich@univ-reunion.fr (P.K.-T.); philippe.despres@univ-reunion.fr (P.D.)

<sup>2</sup> Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188 Diabète athérombose Réunion Océan Indien (DéTROI), 97490 Saint-Clotilde, France; begue.floran@hotmail.fr

\* Correspondence: wildriss.viranaicken@univ-reunion.fr

† Equal contribution.



**Citation:** Lebeau, G.; Frumence, E.; Turpin, J.; Begue, F.; Hoarau, J.-J.; Gadea, G.; Krejbich-Trotot, P.; Desprès, P.; Viranaicken, W. Zika E Glycan Loop Region and Guillain–Barré Syndrome-Related Proteins: A Possible Molecular Mimicry to Be Taken in Account for Vaccine Development. *Vaccines* **2021**, *9*, 283. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030283>

Academic Editor:

Luis Martinez-Sobrido

Received: 3 February 2021

Accepted: 18 March 2021

Published: 19 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 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:** The neurological complications of infection by the mosquito-borne Zika virus (ZIKV) include Guillain–Barré syndrome (GBS), an acute inflammatory demyelinating polyneuritis. GBS was first associated with recent ZIKV epidemics caused by the emergence of the ZIKV Asian lineage in South Pacific. Here, we hypothesize that ZIKV-associated GBS relates to a molecular mimicry between viral envelope E (E) protein and neural proteins involved in GBS. The analysis of the ZIKV epidemic strains showed that the glycan loop (GL) region of the E protein includes an IVNDT motif which is conserved in voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1C (Ca<sub>v</sub>1.2) and Heat Shock 70 kDa protein 12A (HSP70 12A). Both VSCC-alpha 1C and HSP70 12A belong to protein families which have been associated with neurological autoimmune diseases in central nervous system. The purpose of our *in silico* analysis is to point out that IVNDT motif of ZIKV E-GL region should be taken in consideration for the development of safe and effective anti-Zika vaccines by precluding the possibility of adverse neurologic events including autoimmune diseases such as GBS through a potent mimicry with Heat Shock 70 kDa protein 12A (HSP70 12A).

**Keywords:** ZIKV; Guillain–Barré syndrome; molecular mimicry; calcium channel voltage dependent; heat shock protein; vaccine










## 1. Introduction

In the last few decades, there has been an increasing number of epidemics associated with mosquito-borne RNA viruses of medical concern such as Dengue Virus (DENV), West Nile Virus (WNV) or Chikungunya Virus [1]. Like DENV and WNV, Zika Virus (ZIKV) belongs to the flavivirus genus of the *Flaviviridae* family [2]. Classically, ZIKV is transmitted by mosquito bite and the preferred vectors for ZIKV spreading are *Aedes* genus mosquitoes [2,3]. ZIKV was first reported in Uganda in 1947 in a rhesus monkey; however, the virus remained silent for years, only provoking sporadic infections until 2007 [2]. The outbreak worldwide spread urged WHO to declare ZIKV as a major public health issue, leading to a global effort to fight against the disease. ZIKV infection causes clinical manifestation in ~18% of cases ranging from mild disease with a denguelike syndrome, to more severe outcomes such as congenital microcephaly [4–6]. Of note, other neurological disorders have been associated with ZIKV infection, including encephalitis, myelitis and, finally, Guillain–Barré Syndrome (GBS) [5–8]. Moreover, uncommon modes



## Article

# Extracellular Vesicles Are Conveyors of the NS1 Toxin during Dengue Virus and Zika Virus Infection

Daed El Safadi <sup>1</sup>, Grégoire Lebeau <sup>1</sup>, Alisé Lagrave <sup>1</sup>, Julien Mélade <sup>1</sup>, Lauriane Grondin <sup>1</sup>, Sarah Rosanaly <sup>2</sup>, Florian Begue <sup>2</sup>, Mathilde Hoareau <sup>1</sup>, Bryan Veeren <sup>2</sup>, Marjolaine Roche <sup>1</sup>, Jean-Jacques Hoarau <sup>1</sup>, Olivier Meilhac <sup>2</sup>, Patrick Mavingui <sup>1</sup>, Philippe Desprès <sup>1</sup>, Wildriss Viranaïcken <sup>1,\*</sup> and Pascale Krejbich-Trotot <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> 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
- <sup>2</sup> Unité Mixte Diabète Athéromatose Thérapies Réunion Océan Indien (DÉTROÏ), 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



**LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT**

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

Fait à **St. Pierre**, le (date) **11/12/2023**.

Signature :



**Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion**  
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

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

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

En conséquence, chaque utilisateur doit :

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

**La contrefaçon et le faux**

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

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

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

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

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

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



# Résumé

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont essentielles pour une bonne santé cardiovasculaire, grâce notamment à leur transport « inverse » du cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour son élimination. De plus, les HDL exercent de nombreuses autres activités bénéfiques à la fois de type anti-inflammatoire, antioxydantes et anti-infectieuses.

Lors de situations inflammatoires, comme celles rencontrées lors d'infections bactériennes ou virales, les HDL peuvent subir des altérations tant quantitatives de baisse de concentration circulantes que qualitatives, comme la modification de composition et perte d'activités protectrices.

L'humanité fait toujours face à la maladie au coronavirus (COVID-19) caractérisée par une inflammation aiguë et à l'origine de plus de 6,9 millions de morts dans le monde à ce jour.

Aussi, mon travail de thèse a visé la caractérisation des modifications tant quantitatives que qualitatives des HDL durant la COVID-19, l'identification de biomarqueurs spécifiques de modifications retrouvées dans ces HDL et l'essai thérapeutique d'une supplémentation en HDL mimétiques au cours de cette maladie.

La quantification des lipoprotéines circulantes dans le plasma de patients atteints de COVID-19 sévère montre une diminution importante du HDL-cholestérol et d'autres lipoprotéines pouvant constituer autant de biomarqueurs prédictifs de sévérité de la maladie. L'analyse de la distribution des lipoprotéines montre un profil pro-athérogène avec notamment la présence de lipoprotéines de basses densités (LDL) petites et denses dans les plasmas des patients atteints de COVID-19 sévère.

L'analyse qualitative par spectrométrie de masse de la composition tant des HDL que des LDL, montre une présence accrue en protéines de la phase aiguë de l'inflammation au détriment de la partie apoprotéique de ces lipoprotéines quand elles sont isolées de plasma de patients atteints de COVID-19.

Testées sur des cellules endothéliales humaines en culture primaire, les HDL présentent une altération significative de leurs propriétés anti-apoptotique et anti-inflammatoire, lorsqu'elles sont purifiées à partir de plasma de patients atteints de COVID-19.

Enfin, des propriétés anti-inflammatoires d'injections répétées de HDL recombinantes ont pu être mises en évidence chez une patiente admise en réanimation et souffrant d'une forme grave de COVID-19.

Pour conclure, mon travail de thèse apporte des éléments nouveaux de connaissance sur les modifications des lipoprotéines lors de maladie infectieuse, en l'occurrence la COVID-19. Il ouvre aussi des perspectives prometteuses de recherches pour l'utilisation des HDL à la fois comme biomarqueur de sévérité de maladies inflammatoires que comme moyen de lutte thérapeutique.

**Mot-clés** : HDL, protéome, LDL, COVID-19, inflammation, apolipoprotéome, CER-001.