

Université de Montréal

**Syndrome métabolique affectant les survivants de la  
leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique : rôle et  
dysfonctions des lipoprotéines « HDL »**

par Maryse Fournier

Département de nutrition  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en Nutrition

Avril 2017

© Maryse Fournier, 2017

## Résumé

La leucémie lymphoblastique aiguë est le cancer le plus fréquent dans la population pédiatrique. L'amélioration des traitements a permis d'atteindre une survie à 5 ans post-diagnostic surpassant les 90%. Cette réussite de la médecine moderne s'accompagne toutefois d'importants effets à long terme. Ainsi, plus de 65% des survivants présentent au moins une complication sévère comme le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires. Dans ce contexte, une importante proportion de survivants de cancers pédiatriques présente un taux abaissé du contenu en cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-Cholestérol). Les causes d'un tel désordre ne sont pas connues. Les HDLs sont des particules multifonctionnelles primordiales pour le maintien de la santé cardiometabolique, entre autres, de par leurs nombreuses actions antioxydantes, anti-athérosclérotiques, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. L'étude de la fonctionnalité des HDLs dans plusieurs pathologies a révélé des dysfonctionnements importants liés à des altérations de leur composition.

L'objectif de cette étude était de caractériser les HDLs isolées de survivants de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique au niveau de leur composition et fonctionnalité.

Les HDLs des survivants contiennent moins de cholestérol que les HDLs de sujets contrôles. L'analyse du protéome a révélé un enrichissement des HDLs des survivants métaboliquement non sains en protéines pro-thrombotiques (ex : fibrinogène) et pro-inflammatoires (ex : amyloïde sérique A). La capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol ainsi que la capacité antioxydante de ces HDLs n'en était pas affectée.

Les résultats de ces travaux indiquent une altération de la composition et du protéome des HDLs de survivants de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique. Bien que plus d'études soient nécessaires pour la validation de la fonctionnalité de ces HDLs, ces travaux semblent pertinents pour la santé des survivants étant donné la révélation de biomarqueurs potentiels du métabolisme et de la fonctionnalité des HDLs, et donc de l'athérosclérose.

**Mots-clés :** Lipoprotéines, HDL, survivants de cancers, syndrome métabolique, protéomique

## **Abstract**

Acute lymphoblastic leukemia is the most frequent malignancy in children. With the use of more modern, efficient treatments, 5-year survival has reached more than 90% in this population. However, this achievement comes with many long-term effects: more than 65% of the survivors experience at least one severe complication, including the metabolic syndrome and cardiovascular diseases. In this context, a significant proportion of pediatric cancer survivors have low HDL-Cholesterol levels. The causes of such an abnormality remain so far unknown. HDLs are multifunctional particles, which are primordial in maintaining cardiovascular health given their antioxidative, anti-atherosclerosis, anti-inflammatory and anti- thrombotic capacities, to name but a few functions. Accordingly, studies on HDL functionality in diverse pathologies have revealed some important losses of functions linked to an altered composition.

The main objective of the present work was to characterize the composition and functionality of HDLs isolated from pediatric acute lymphoblastic leukemia survivors.

The HDL fractions from the survivors contained less cholesterol than the controls. In addition, proteomic analyses using mass spectrometry revealed an enrichment of pro-thrombotic (e.g. fibrinogen) and pro-inflammatory (e.g. serum amyloid A) proteins in the HDLs deriving from metabolically unhealthy survivors. The cholesterol efflux and antioxidant capacities of these HDLs were similar to those of the controls.

These results indicate an alteration in the composition of lipid and protein content of HDLs from childhood acute lymphoblastic leukemia survivors with metabolic disorders. Although more work is needed to validate the functionality of these HDLs, the data seem relevant for survivor health given the detection of potential biomarkers related to HDL metabolism and functionality in cancer.

**Keywords** : Lipoproteins, HDL, cancer survivors, metabolic syndrome, proteomics

# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	2
Table des matières.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des figures .....	6
Liste des sigles et abréviations.....	7
Remerciements.....	10
Chapitre 1 : Introduction.....	11
Les cancers pédiatriques .....	12
Quelques particularités des cancers pédiatriques.....	12
La leucémie lymphoblastique aiguë.....	13
Les effets tardifs.....	17
Les lipoprotéines de haute densité (HDL) .....	18
La composition des HDLs .....	19
Les fonctions des HDLs et leurs mécanismes d'action .....	22
Les dysfonctions des HDLs rapportées en condition pathologique.....	30
Les HDLs dans le cancer .....	34
Cancers actifs.....	34
Survivants de cancer .....	38
Chapitre 2 : Objectifs.....	40
Chapitre 3 : La protéomique des HDLs isolées de survivants de la LLA pédiatrique.....	41
Chapitre 4 : Évaluation de la fonctionnalité des HDLs de survivants de la LLA pédiatrique..	88
Méthodologie .....	88
Sélection des participants pour les tests avec les HDL <sub>3</sub> .....	88
Mesure de la capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol.....	89
Mesure du potentiel antioxydant des HDLs.....	91

Analyses statistiques .....	92
Résultats .....	93
Caractéristiques des participants .....	93
Composition des lipoprotéines .....	95
Mesure de l'efflux de cholestérol médié par les HDLs .....	96
Mesure de la capacité antioxydante des HDLs .....	98
Chapitre 5 : Discussion .....	100
Composition générale des HDLs .....	101
Analyse du protéome par spectrométrie de masse .....	102
Capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol .....	107
Capacité antioxydante .....	109
Chapitre 6 : Conclusion .....	111
Bibliographie .....	112

## Liste des tableaux

Tableau I. Compilation non-exhaustive des études de la composition des HDLs, ainsi que leur fonctionnalité en condition pathologique.....	31
Tableau II. Bilan anthropométrique et métabolique des participants dont les HDL <sub>3</sub> ont été isolées .....	94
Tableau III. Détails des traitements reçus par les participants (HDL <sub>3</sub> ).....	95
Tableau IV. Composition des HDL <sub>3</sub> .....	96

## Liste des figures

Figure 1. Différenciation des cellules sanguines .....	14
Figure 2. La composition globale des HDLs .....	19
Figure 3. La maturation des HDLs .....	20
Figure 4. Le protéome des HDLs et sa participation dans la fonctionnalité des HDLs.....	22
Figure 5. Le transport inverse du cholestérol.....	24
Figure 6. Mécanismes antihypertenseurs des HDLs.....	25
Figure 7. Voie de signalisation cellulaire impliquée dans la prévention de l'apoptose par les HDLs.....	26
Figure 8. Représentation des fonctions anti-hypertensive, anti-apoptotique, anti-inflammatoire et anti-thrombotique des HDLs.....	29
Figure 9. Mesure de l'efflux de cholestérol à partir des cellules CaCo-2/15.....	97
Figure 10. Mesure de l'efflux de cholestérol à partir des cellules THP-1 .....	98
Figure 11. Mesure de la fonction antioxydante des HDLs totales. ....	99

## Liste des sigles et abréviations

Les abréviations en anglais sont en italique.

A1AT : Alpha-1-antitrypsine

ABCA1: *ATP-binding cassette transporter A1*

ABCG1: *ATP-binding cassette transporter G1*

ADN : acide désoxyribonucléique

AGPI : Acides gras à chaînes polyinsaturées

AGS : Acides gras à chaînes saturées

Akt : Protéine kinase B

Apo : Apolipoprotéine

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

BHT : 2,6-Di-Tert-butyl-4-méthylphénol

CE : Cholestérol estérifié

CETP : *Cholesterol ester transfer protein*

CHUSJ : Centre hospitalier universitaire Sainte-Justine

CL : Cholestérol libre

CT : Cholestérol total

DCFH-DA : *Dichlorodihydrofluorescein diacetate*

e-selectin : *Endothelial-selectin*

eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*

EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique

ERK: *Extracellular-signal-regulated kinases*

ESRD: *End-stage renal disease*

FDR: *False discovery rate*

FPLC: *Fast protein liquid chromatography*

Gy: Gray

HDL : Lipoprotéine de haute densité

HDL-C : HDL-Cholestérol

HPR : *Haptoglobin-related protein*

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*  
IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire  
IL-6 : Interleukine-6  
IMC : Indice de masse corporelle  
KBr: Bromure de potassium  
LCAT: *Lecithin/cholesterol acyltransferase*  
LC-MS/MS: *Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*  
LDL : Lipoprotéine de faible densité  
LE : Lupus érythémateux  
LLA: Leucémie lymphoblastique aiguë  
LMA : Leucémie myéloblastique aiguë  
LOH : Hydroxyde lipidique  
LOOH : Hydroperoxyde lipidique  
LPDS : *Lipoprotein-deficient serum*  
LXR : Liver X receptor  
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*  
MCP-1 : *Monocyte chemotactic protein-1*  
MDA : Malondialdéhyde  
MetS : Syndrome métabolique  
MPO: Myéloperoxydase  
NCEP ATP III : *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Program III*  
NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor- $\kappa$ B*  
NO: Oxyde nitrique  
oxLDL: LDL oxydés  
oxPL: *Short-chain oxidized phospholipids*  
PAF-AH: *Platelet activating factor-acetylhydrolase*  
PC: Phosphatidylcholine  
PCYOX: Prénylcystéine oxydase  
PGI<sub>2</sub>: Prostaglandine I<sub>2</sub>  
PI-3K: Phosphoinositide-3-kinase  
PL: Phospholipides

PLTP: *Phospholipid transfer protein*  
PON1: *Serum paraoxonase/arylesterase 1*  
PON3: *Serum paraoxonase/lactonase 3*  
S1P: Sphingosine-1-phosphate  
SAA: Amyloïde sérique A  
Ser : Sérine  
SM: Sphingomyéline  
SNC: Système nerveux central  
SR-B1: *Scavenger receptor type B member 1*  
TBARS: *Thiobarbituric acid reactive species*  
TG: Triglycérides  
Thr: Thréonine  
TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor  $\alpha$*   
VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule-1*  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
VLDL: Lipoprotéine de très faible densité

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenue dans mes aventures et m'ont encouragée à atteindre mon plein potentiel. Le niveau de confiance que vous avez en moi est une source de fierté infinie. Ce mémoire, c'est un peu de vous aussi. Merci pour tout.

Évidemment, je remercie le Dr Levy ainsi que son équipe, pour l'accompagnement, le soutien et la formation dont j'ai bénéficié au cours des années passées avec vous. Dr Emile Levy, Carole Garofalo, Schohrya Spahis, Alain Sané, Danielle Saint-Cyr-Huot, un grand Merci!

Un merci tout spécial à mes amis, à qui j'ai dit beaucoup trop souvent «je ne peux pas je travaille...», «je dois écrire mon mémoire», qui m'ont permis de ventiler mes frustrations, ou qui ont supporté mes grands discours dans lesquels j'essaie de leur expliquer mon projet. Cynthia Chabot, on part en vacances! Louis-Philippe Morissette, Carol-Ann St-Germain, Karine Malo, Kevin Vallée, Olivier Pontbriand-Paré, je vais finalement pouvoir participer aux activités avec vous. Corinne Gionet, je vais enfin voir ton bébé (qui n'est vraiment plus si petit!) Paméla Dionne, nouvelle coloc, merci d'avoir toléré mon bordel pendant les derniers moments de rédaction, je te promets que je me ramasse mieux d'habitude! Fanny Morland, on va pouvoir changer de principal sujet de discussion, juste à temps pour voir le bout du nez de ton petit trésor en plus!

Je ne peux pas terminer sans remercier les étudiants du laboratoire, avec lesquels j'ai passé d'excellents moments, et qui m'ont fait grandir en tant que jeune adulte. Marie-Laure «Doc» Kleme-Amani, merci pour ta bienfaisance et ta clairvoyance. Pantéa Yeganeh, les journées auraient été bien plus tristes sans ta joie de vivre! Merci pour tous les encouragements, pour avoir partagé ta culture avec nous, et pour m'avoir ouvert les yeux. Jade Leahy, merci pour toute ton aide, pour avoir souffert avec moi en protéomique, et pour toutes les histoires drôles. Sophia Morel et Véronique Bélanger, je pense que j'en ai plus appris sur la nutrition avec vous que pendant le bac. Vous êtes une source d'inspiration pour moi, merci pour tout.

Finalement, merci aux nouveaux Nickolas Auclair et Marc-André Lecours, à mon esclave Sophie-Rose Kaminski-Ouellet et à tous les stagiaires. Ce fut un plaisir.

# Chapitre 1 : Introduction

Le terme cancer est un terme général regroupant plus d'une centaine de maladies dont le point commun est une prolifération anarchique de cellules dont le comportement est anormal et la fonction est altérée. Au cours du processus cancéreux, les cellules d'un tissu en particulier n'entrent plus en apoptose; elles deviennent « éternelles » et ne répondent plus aux signaux dictant l'arrêt de la division cellulaire, augmentant ainsi leur nombre bien au-delà des besoins physiologiques, ce qui crée des masses malignes, les tumeurs. La multiplication des cellules tumorales est rapide et n'inclut plus une différenciation complète en cellules matures et fonctionnelles. Parce que leur croissance n'est plus inhibée par la présence d'un nombre suffisant de cellules saines, (la rétro-inhibition, l'inhibition d'une réaction par l'accumulation du produit de cette réaction), elles peuvent aussi envahir les tissus avoisinants. De plus, les cellules cancéreuses ne sont pas très cohésives; elles ont la capacité de créer des métastases, c'est-à-dire se détacher de la tumeur primaire et se mouvoir dans les circulations sanguine et lymphatique avant de fonder un nouveau foyer tumoral (1, 2). Bien qu'il y ait de nombreuses différences entre les cancers pédiatriques et « adultes », ce processus pathologique est commun à tous.

Chez les enfants, le cancer le plus fréquent est la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA), un cancer pour lequel les taux de survie atteignent actuellement plus de 90% à 5 ans post-diagnostic (3). Alors que les survivants de cancers pédiatriques sont de plus en plus nombreux, et vivent plus longtemps, on observe plusieurs effets secondaires, dont une prévalence augmentée de désordres métaboliques dans cette jeune population (4). Parmi ces désordres, une diminution du contenu en cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL-Cholestérol) est fréquemment rapportée, représentant un risque élevé de maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose (5). En plus d'agir sur les niveaux de cholestérol dans les HDLs, le cancer et ses traitements pourraient avoir un impact sur leur composition générale et leur diversité protéomique. Aucune donnée n'est présentement disponible sur ce sujet.

## **Les cancers pédiatriques**

Les cancers de l'enfant ne sont pas fréquents, ne représentant que 0,5-1% des cancers diagnostiqués chaque année au Canada. En 2016, 1450 Canadiens âgés de 0 à 19 ans devraient recevoir un diagnostic de cancer, et environ 160 en décèderont, ce qui fait du cancer la première cause de mortalité due à une maladie dans cette population (3). Trois types de cancer sont majoritairement diagnostiqués chez l'enfant : les leucémies (32%), les cancers du système nerveux central (SNC, 19%) et les lymphomes (11%) (3, 6). L'incidence des cancers pédiatriques est relativement stable depuis 1985. Fort heureusement, les taux de survie (tous cancers inclus) ont augmenté de façon importante, et atteignent maintenant 83% 5 ans après le diagnostic (3, 7).

### **Quelques particularités des cancers pédiatriques**

Les cancers de l'enfant se distinguent des cancers plus typiquement « adultes » à plusieurs niveaux. En effet, l'initiation du processus pathologique, le diagnostic et l'établissement du pronostic sont particuliers en pédiatrie. Également, tout ce qui entoure les traitements (objectifs, modalités, tolérance, effets à long terme, nécessité de suivi à long terme) a dû être adapté pour les jeunes enfants (8, 9).

Tout d'abord, les cancers de l'enfant sont généralement beaucoup plus agressifs. La croissance très rapide des tumeurs s'accompagne de périodes de latence extrêmement courtes et augmente les possibilités de maladies déjà métastatiques au moment du diagnostic (jusqu'à 55% des cancers pédiatriques sont métastatiques à la présentation) (9). Les tissus les plus souvent affectés en pédiatrie sont les tissus conjonctifs (sarcomes) et hématopoïétiques (leucémies). Il n'y a pratiquement pas de cancers du tissu épithélial (carcinomes) chez les enfants (9). On ne peut généralement pas identifier de cause environnementale ou comportementale relative au développement du cancer de l'enfant, alors que plusieurs cancers de l'adulte peuvent être liés aux habitudes de vie comme le tabagisme (8), la consommation d'alcool (10), l'exposition au soleil (11) ou à l'amiante (12), et la sédentarité (13, 14). Les enfants ont aussi de meilleurs taux de survie au cancer, soit en moyenne 80% des enfants qui survivent à leur cancer, contre seulement 60% des adultes (9). Au niveau des traitements, on administre de la chimiothérapie tant aux enfants qu'aux adultes, mais les agents anti-cancéreux utilisés sont adaptés aux types

de cancers à traiter et diffèrent donc entre ces 2 populations. En pédiatrie, les traitements sont extrêmement intenses et complexes; les doses administrées correspondent au maximum de ce qui est physiquement toléré (8). On doit aussi tenir compte de l'espérance de vie lorsqu'on traite un enfant, et donc on tente de limiter les complications à long terme. Ainsi, on vise à réduire la toxicité au minimum, tout en maintenant la même efficacité thérapeutique (9). Finalement, les survivants de cancers pédiatriques nécessitent un suivi à très long terme car certaines complications peuvent se manifester plusieurs années après la fin des traitements; on les appelle les effets tardifs. Les désordres métaboliques tels que l'obésité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypertension sont présents dans une proportion significative de survivants et mettent ces derniers à risque de développer des conditions plus sérieuses comme les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 (4, 5, 9).

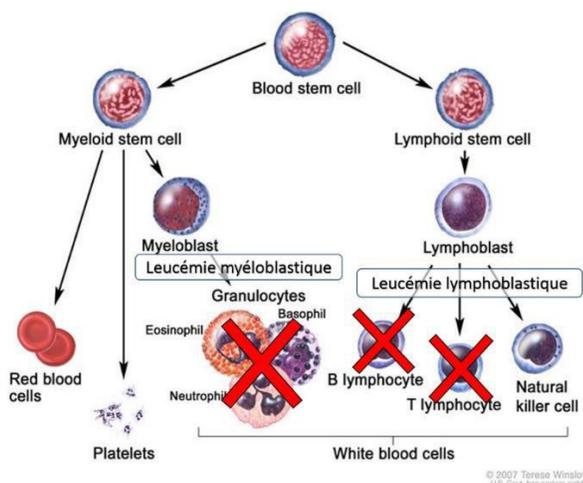
### **La leucémie lymphoblastique aiguë**

La leucémie est le cancer le plus fréquent dans la population pédiatrique. Il s'agit d'un cancer hématologique au cours duquel les cellules cancéreuses s'accumulent dans les tissus hématopoïétiques de la moelle osseuse, et où leur grand nombre entrave le fonctionnement des cellules normales. Les cellules immatures sont appelées « blastes » et, tout comme les cellules métastatiques, elles peuvent infiltrer d'autres organes comme le foie, les testicules et le système nerveux central (SNC) (2). Deux sous-types de leucémie représentent la majorité des diagnostics: la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA, 76% des diagnostics québécois) et la leucémie myéloïde aiguë (LMA) (7). Leur origine cellulaire est illustrée à la **Figure 1** (page 14). On catégorise la LLA selon qu'elle affecte les lymphocytes B ou les lymphocytes T. Le taux de survie pour ce cancer a augmenté de façon phénoménale. Alors que dans les années 1950, aucun patient ne survivait plus de 3 mois après le diagnostic, et qu'en 1970, le taux de survie avait grimpé à un maigre 15%, la LLA fait maintenant partie des cancers ayant les meilleurs taux de survie, soit 91% des patients en vie 5 ans après leur diagnostic (3, 15).

La leucémie aiguë se développe très rapidement; il suffit de quelques jours à quelques semaines pour que les cellules cancéreuses soient assez nombreuses et entraînent l'apparition de symptômes comme la fatigue, la fièvre, les ganglions lymphatiques enflés, les troubles de coagulation (tendance à faire des ecchymoses et à saigner abondamment), la perte d'appétit et

les maux de tête (2). Pour une raison encore inconnue, la LLA affecte un peu plus les garçons que les filles, et plus les caucasiens que les autres ethnies (6, 9).

**Figure 1.** Différenciation des cellules sanguines



Adapté du National Cancer Institute (1) © 2007 Terese Winslow, U.S. Govt. has certain rights (Reproduit avec permission) Cette figure présente les 2 types principaux de leucémie, soit la leucémie lymphoblastique et la leucémie myéloblastique. Les X rouges représentent l'arrêt de la différenciation des lymphoblastes et des myéloblastes en lymphocytes (B ou T) et en granulocytes, menant à l'accumulation des précurseurs (blastes) dans la moelle osseuse.

### Les traitements de la LLA

Les traitements de la LLA sont adaptés à l'état clinique du patient ainsi qu'à son niveau de risque, qui dépend de certains facteurs pronostiques comme l'âge au diagnostic, la génétique des cellules cancéreuses et leur nombre, ainsi que la propagation de la maladie (16). L'objectif, dans cette population, est d'assurer la guérison, tout en minimisant l'impact des traitements sur le futur du patient. Les enfants dont le pronostic est moins prometteur recevront un traitement plus intense afin de maximiser leurs chances de survie, tandis qu'on tentera de limiter la toxicité des traitements chez ceux qui ont un niveau de risque moins élevé (9, 16). Au total, un traitement peut durer de 2 à 4 ans avant que le patient soit officiellement en rémission complète (2).

### *La chimiothérapie*

Les traitements de chimiothérapie sont généralement répartis en 4 phases : l'induction, la prophylaxie du SNC, la consolidation et le maintien (1, 2, 16). L'ordre d'administration et les combinaisons de molécules peuvent varier selon les protocoles suivis. La majorité de la chimiothérapie est administrée par voie intraveineuse. Une certaine partie est cependant injectée en voie intrathécale, c'est-à-dire directement dans le liquide céphalo-rachidien, car plusieurs molécules ne traversent pas assez bien la barrière hémato-encéphalique (15).

La phase d'induction est entreprise le plus tôt possible pour éliminer les cellules cancéreuses et ainsi rétablir la différenciation des blastes en cellules matures. Elle dure de 4 à 6 semaines et permet à 98% des patients d'entrer en rémission (16). La deuxième phase, la prophylaxie du SNC, vise à détruire toutes les cellules cancéreuses restantes et à prévenir une rechute pendant que la moelle osseuse reprend ses fonctions normales. Les traitements prophylactiques peuvent également être administrés en concomitance aux autres phases (2). Vient ensuite la phase de consolidation, d'une durée de 6 à 8 mois, dont l'objectif est de maintenir la rémission. L'intensité des traitements administrés est ajustée individuellement selon le facteur de risque de récurrence. La dernière phase, celle de maintien, consiste à administrer une chimiothérapie de faible intensité à long terme, jusqu'à 2 ou 3 ans après l'entrée en rémission (2, 17).

En plus de leur toxicité immédiate, plusieurs des molécules utilisées ont été directement liées au développement de complications à long terme comme des cancers secondaires, des troubles cardiaques, la fibrose hépatique et la stérilité (18, 19).

### *La radiothérapie*

La radiothérapie consiste à envoyer des rayons à haute énergie vers une zone ciblée (généralement une tumeur solide, ou la zone crânienne dans les cas d'atteinte du SNC), de façon à endommager l'ADN des cellules cancéreuses, et entraîner leur mort. La multiplication très rapide des cellules cancéreuses et leur faible capacité à réparer les dommages à leur ADN les rendent particulièrement sensibles aux rayonnements ionisants (2). Chez les enfants, irradier la zone crânienne a été associé à des troubles de la croissance et du développement : c'est pourquoi la radiothérapie n'est pas incluse d'emblée dans les protocoles de traitement de la LLA, et qu'elle est administrée le plus tardivement possible chez les jeunes patients (6, 16). La

radiothérapie sera utilisée pour traiter une infiltration du SNC ou des testicules par les lymphoblastes, ainsi que pour prévenir une telle infiltration chez les patients à risque élevé.

Les atteintes neurologiques sont fréquemment retrouvées chez des patients ayant reçu de la radiothérapie pendant l'enfance (20). Plus la dose administrée est grande, plus les probabilités sont importantes de développer des troubles neurologiques en vieillissant. L'âge de l'enfant au moment du traitement influe aussi sur la gravité des dérangements : plus l'enfant est jeune au moment du traitement, plus les effets secondaires seront conséquents (21). C'est pour cette raison que l'on retarde au maximum l'administration de la radiothérapie aux jeunes de moins de 5 ans (6).

Les effets à long terme observés varient selon les structures du cerveau qui sont touchées. Un désordre de la sécrétion d'hormones régulatrices peut mener à une altération de la croissance (plus petite taille, développement physique global stoppé prématurément), une diminution de l'activité de la thyroïde (hypothyroïdie liée à une baisse du métabolisme de base et développement physique et mental ralenti), ainsi qu'un déclenchement précoce ou retardé de la puberté par une variation des taux d'hormones sexuelles (22).

### *La greffe de cellules souches*

Dans les cas de LLAs réfractaires (qui ne réagissent pas bien au traitement), de LLAs présentant le chromosome Philadelphie, de LLAs récidivantes ou à risque élevé de récurrence, ainsi que chez les nourrissons de moins d'un an, une greffe de cellules souches peut être envisagée (2). Cette procédure constitue une intervention invasive, exigeant une expertise très spécialisée, et comportant des risques importants. Le rétablissement suite à une greffe peut prendre des mois, pendant lesquels le patient est très vulnérable. Le taux de mortalité un an après la procédure varie de 20 à 50% (23).

La préparation pour une greffe de cellules souches implique une irradiation corporelle totale et de très grandes doses de chimiothérapie (doses létales) visant à éliminer complètement la moelle osseuse et le système immunitaire du receveur (24). La transplantation en soi consiste à infuser au patient des cellules souches prélevées d'un donneur compatible (préférentiellement issu de la fratrie) par accès veineux central. Les cellules saines vont recoloniser la moelle osseuse et démarrer l'hématopoïèse dans un délai habituel de 2 semaines (23). Pendant ce délai, le patient doit être confiné à une chambre avec environnement contrôlé pour éviter qu'il ne

développe une infection opportuniste. En effet, son système immunitaire est très affaibli par le conditionnement et par la médication d'immunosuppression administrée pour prévenir le rejet des cellules greffées. De plus, l'immunité liée aux lymphocytes B et T peut prendre plus d'un an à atteindre son niveau antérieur à la maladie (24). Les survivants à plus long terme d'une greffe de cellules souches peuvent développer de nombreux effets tardifs liés aux traitements de conditionnement, à la transplantation et aux médicaments d'antirejet dont les cancers secondaires, l'athérosclérose précoce, les troubles endocriniens, l'infertilité, l'ostéoporose, le diabète, l'hypertension, l'hyperlipidémie, l'insuffisance rénale, la dépression et l'obésité (4, 24).

### **Les effets tardifs**

Certaines complications dues aux traitements de la LLA peuvent apparaître jusqu'à 10 ans après la fin de ceux-ci. Plus les survivants vieillissent, plus ils sont nombreux à présenter des conditions chroniques liées aux traitements. On estime que les deux tiers des survivants en développeront au moins une et, dans 25% des cas, cette condition sera sévère ou potentiellement mortelle (4, 6). Pratiquement tous les systèmes physiologiques peuvent être atteints, soit les systèmes cardiaque (cardiotoxicité, insuffisance cardiaque, infarctus du myocarde), circulatoire (athérosclérose et maladies cardiovasculaires) (18), endocrinien (hypothyroïdie, déficit d'hormone de croissance, déficit en hormones hypothalamo-hypophysaires), musculo-squelettique (ostéoporose, ostéonécrose, petite taille, scoliose), neurologique (atteintes motrices et cognitives), hépatique (insuffisance hépatique), pulmonaire (fibrose pulmonaire, pneumonie interstitielle), rénal (insuffisance rénale), ou reproducteur (puberté précoce, hypogonadisme, infertilité) (4, 25, 26). Les retards de croissance, l'obésité, les déficits neurocognitifs, les désordres métaboliques (dyslipidémie, diabète, hypertension, syndrome métabolique) et les cancers secondaires (surtout de la thyroïde et du sein) sont aussi présents (18, 26, 27). Jusqu'à 60% des survivants de cancers pédiatriques présentent des désordres endocriniens (25). Plus de 20% des survivants développeront un cancer secondaire dans les 30 ans suivant le diagnostic initial, et 47% d'entre eux en auront plusieurs (27). Comparativement à leurs frères et sœurs, les survivants de cancers pédiatriques ont 2 fois plus de risques de développer un diabète de type 2, de l'hypertension ou une dyslipidémie (28). Ils ont aussi un risque 9 fois plus élevé de subir un accident vasculaire cérébral, 10 fois plus élevé de développer une maladie coronarienne, et 15 fois plus élevé de souffrir d'insuffisance cardiaque (4). Les différentes séquelles vécues par les

survivants varient selon les modalités de traitement comme les agents de chimiothérapie administrés (et leur dosage), l'addition ou non de radiothérapie au protocole, l'âge auquel le patient a été exposé à ces éléments, ainsi que le temps écoulé depuis la fin des traitements. Ainsi, vaincre le cancer ne représente pas la fin du parcours des survivants dans le réseau de la santé. Leurs besoins spécifiques en soins médicaux représenteront une charge grandissante pour le réseau de santé, particulièrement en sachant que la cohorte de survivants de cancers pédiatriques grossit avec l'amélioration des taux de survie, et que les survivants vivent plus longtemps.

### **Le syndrome métabolique (MetS)**

Les études sur la prévalence du MetS chez les survivants de cancers pédiatriques rapportent des résultats variables, de 0 à 40% (29), partiellement dû aux différences entre les définitions utilisées, ainsi qu'aux caractéristiques des cohortes (nombre de survivants, âge, type de cancer, durée du suivi, etc.) Plusieurs études ont également des résultats partiels, n'ayant considéré individuellement que quelques désordres métaboliques, et non pas le MetS au complet. De plus, rares sont les études qui incluent un groupe contrôle ou un nombre assez élevé de survivants (en moyenne moins de 50 sujets).

La définition du MetS la plus utilisée est celle du National Cholesterol Education Program Adult Treatment Program III (NCEP ATP III) (30), soit un tableau clinique comportant au moins 3 des désordres suivants: i) obésité abdominale (tour de taille supérieur à 88 cm pour les femmes; 102 cm pour les hommes); ii) dyslipidémie comportant le HDL-C abaissé ( $< 1,03$  mmol/L pour les hommes;  $< 1,29$  mmol/L pour les femmes) ou les triglycérides élevées ( $> 1,7$  mmol/L); iii) hypertension artérielle (PAS  $> 130$  mmHg, ou PAD  $> 85$  mmHg); et iv) résistance à l'insuline (glycémie à jeun  $> 6,1$  mmol/L) (30). Des niveaux diminués de HDL-C sont fréquemment retrouvés chez les survivants de cancer, une condition défavorable chez des sujets présentant déjà un risque élevé de désordre métabolique (5, 29). La composition des HDLs n'a pas été étudiée dans cette population, bien qu'elle soit probablement altérée.

### **Les lipoprotéines de haute densité (HDL)**

Les HDLs ont été identifiées pour la première fois en 1929 par Michel Macheboeuf (31). Depuis, leur action primordiale dans la prévention des maladies athérosclérotiques leur a valu le surnom de « bon cholestérol ». En effet, le lien entre un taux abaissé de HDL-C sérique et

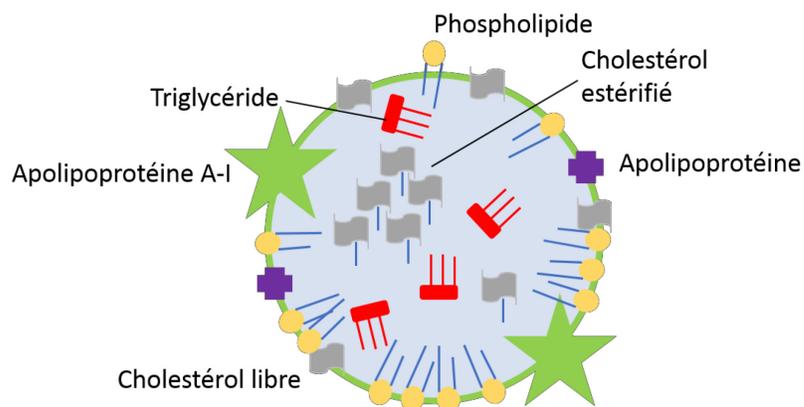
une augmentation des événements cardiovasculaires a été rapporté dès 1954 (32), et répété maintes fois depuis, incluant par la Framingham Heart Study (33).

## La composition des HDLs

Les HDLs sont constituées d'une monocouche de lipides amphipathiques, les phospholipides (PL) et le cholestérol libre (CL), stabilisée par des apolipoprotéines (apo), et d'un cœur lipidique très hydrophobe contenant peu de triglycérides (TG), mais beaucoup de cholestérol estérifié (CE) (**Figure 2**, page 19).

Il existe plusieurs catégories de HDL, classées selon leur taille et leur densité. Parce qu'ils contiennent relativement plus de lipides, et moins de phospholipides et protéines, les HDL<sub>2</sub> ont une densité plus faible, établie à 1,063-1,125 g/ml. Les HDL<sub>3</sub> contiennent quant à eux une plus grande proportion de protéines, ce qui leur donne une densité de 1,125-1,21 g/ml.

**Figure 2.** La composition globale des HDLs

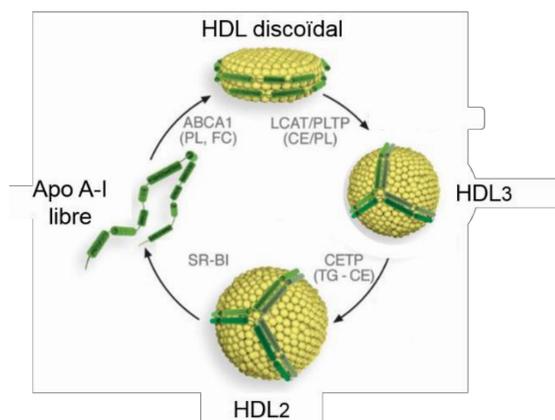


L'hétérogénéité des HDLs ne s'arrête pas là : les espèces lipidiques et protéiques varient de façon importante entre les HDL<sub>2</sub> et les HDL<sub>3</sub> (34). Cette variation leur permet d'accomplir une grande diversité de rôles physiologiques. Plusieurs apo communément retrouvées sur les HDLs, dont l'Apo A-I, l'Apo A-II et l'Apo E, peuvent s'en dissocier et se lier de façon temporaire à une lipoprotéine contenant l'apo B (VLDL, IDL, LDL), ou simplement changer de particule HDL. La conformation tertiaire des apolipoprotéines peut également changer selon les caractéristiques des HDLs comme leur taille et leur composition, exposant ou non les sites

importants de liaison au substrat ou récepteur de ladite protéine, ce qui affecte sa fonctionnalité et le métabolisme subséquent des lipoprotéines (35).

Les HDLs « naissantes » sont formées par le foie et l'intestin. L'Apo A-I ainsi sécrétée interagit avec le transporteur membranaire *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1), qui lui transfère des lipides (cholestérol libre et phospholipides), formant ainsi une HDL « discoïdale ». L'enzyme *lecithin : cholesterol acyltransferase* (LCAT) est responsable d'estérifier le cholestérol sur les HDLs. Le cholestérol estérifié, de par sa nature hydrophobe, quitte la surface de la lipoprotéine pour s'insérer dans son centre hydrophobe, créant ainsi un gradient qui permet le transfert de nouvelles molécules lipidiques. L'augmentation de la taille des HDLs par l'incorporation de lipides les fait passer de HDLs discoïdales à HDL<sub>3</sub>, puis à HDL<sub>2</sub> (**Figure 3**, page 20). En plus de la LCAT, le contenu lipidique des HDLs est modifié par des facteurs plasmatiques comme la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP), qui transfère les triglycérides des lipoprotéines à Apo B vers les HDLs et redistribue le cholestérol des HDLs vers ces lipoprotéines, ainsi que par la *phospholipid transfer protein* (PLTP), qui ajoute des phospholipides à la membrane des HDLs (36).

**Figure 3.** La maturation des HDLs



Adapté de Kratzer 2014 (35) (Reproduit avec permission)

ABCA1 : *ATP-binding cassette transporter A1*, Apo : Apolipoprotéine, CE : Cholestérol estérifié, CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*, FC : Cholestérol libre, LCAT : *Lecithin/cholesterol acyltransferase*, PL : Phospholipides, PLTP : *Phospholipid transfer protein*, TG : Triglycérides, SR-B1 : *Scavenger receptor type B member 1*

## Le lipidome

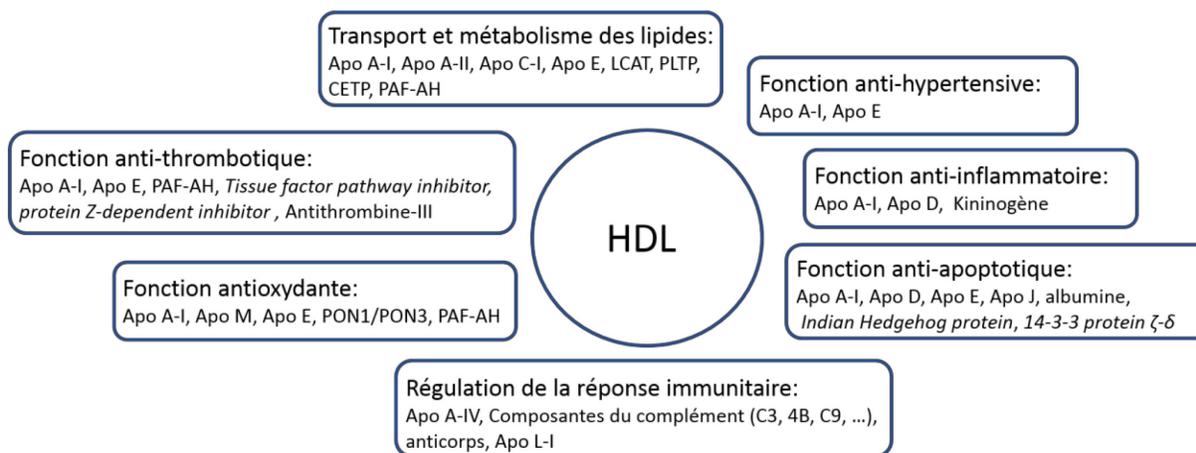
Les études de lipidomique ont permis d'identifier, à ce jour, plus de 200 espèces de lipides faisant partie des HDLs. On peut les répartir en 4 grandes classes : le cholestérol libre, les phospholipides, les sphingolipides, et les lipides neutres (CE et TG) (37, 38). La phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide prédominant du lipidome des HDLs, représentant environ 30% des lipides totaux. Les autres phospholipides constituent 10-30% des HDLs, les esters de cholestérol 30-40%, le restant étant réparti entre les triglycérides et les sphingolipides. Plusieurs espèces, particulièrement les phospholipides, sont biologiquement actives, et peuvent initier une signalisation cellulaire (39-41). Parmi les sphingolipides, la sphingomyéline et la sphingosine-1-phosphate sont celles qui ont le plus d'impact fonctionnel. La sphingomyéline est connue pour augmenter la rigidité des membranes qui la contiennent, ce qui limite la capacité des HDLs à internaliser les lipides oxydés et le cholestérol, ainsi qu'à transférer ces lipides au foie par l'intermédiaire de son récepteur *scavenger receptor class B member 1* (SR-B1). La sphingosine-1-phosphate, bien que présente en très petite quantité, est particulièrement active au niveau vasculaire, où elle prévient l'apoptose des cellules endothéliales (37, 42).

## Le protéome

L'amélioration des techniques de spectrométrie de masse a permis d'augmenter la précision des études de protéomique des HDLs. Ces travaux rapportent un nombre étonnamment croissant de protéines différentes. Selon une compilation du *HDL Proteome Watch* (disponible en ligne à <http://homepages.uc.edu/~davidswm/HDLproteome.html>), près de 100 protéines font plausiblement partie des HDLs. Ces protéines sont particulièrement importantes afin de maintenir la structure des HDLs, en plus d'être à la base de plusieurs fonctions, tel qu'illustré de façon simplifiée à la **Figure 4** (page 22). L'apolipoprotéine A-I représente environ 75% des protéines des HDLs. Le restant est constitué d'apolipoprotéines, d'enzymes, de protéines de transfert des lipides, de protéines de la phase aiguë, de composantes du complément, d'inhibiteurs de protéases, et de protéines ayant d'autres fonctions (43, 44). Certaines protéines des HDLs ont un effet directement lié à la bonne fonction des HDLs, tandis que d'autres ont l'effet opposé, par exemple l'inhibition du métabolisme des lipides par l'Apo C-III (45). Seules les protéines dont l'action est favorable ont été incluses dans la Figure 4. Quelques protéines, dont l'Apo A-I et l'Apo E, agissent à plusieurs niveaux. Finalement, certaines protéines

retrouvées sur les HDLs ne semblent pas avoir de lien direct avec la fonctionnalité des lipoprotéines.

**Figure 4.** Le protéome des HDLs et sa participation dans la fonctionnalité des HDLs.



Apo : apolipoprotéine, CETP : *cholesteryl ester transfer protein*, LCAT : *Lecithin/cholesterol acyltransferase*, PAF-AH : *Platelet activating factor-acetylhydrolase*, PLTP : *Phospholipid transfer protein*, PON1 : *Serum paraoxonase/arylesterase 1*, PON3 : *Serum paraoxonase/lactonase 3*

## Les fonctions des HDLs et leurs mécanismes d'action

Suite aux nombreuses déceptions des thérapies visant à augmenter les niveaux de cholestérol transporté par les HDLs pour réduire les maladies cardiovasculaires (46, 47), l'hypothèse de plus en plus acceptée est que le meilleur marqueur du risque de ces maladies ne serait pas la quantité de cholestérol contenu dans les HDLs, mais plutôt une mesure de leur fonctionnalité dépendant de leur composition globale en lipides et protéines. En effet, les HDLs sont essentiels au maintien de l'homéostasie parce qu'ils réalisent le transport inverse du cholestérol, mais aussi parce qu'ils sont antihypertenseurs, anti-apoptotiques, anti-inflammatoires, antioxydants et anti-thrombotiques.

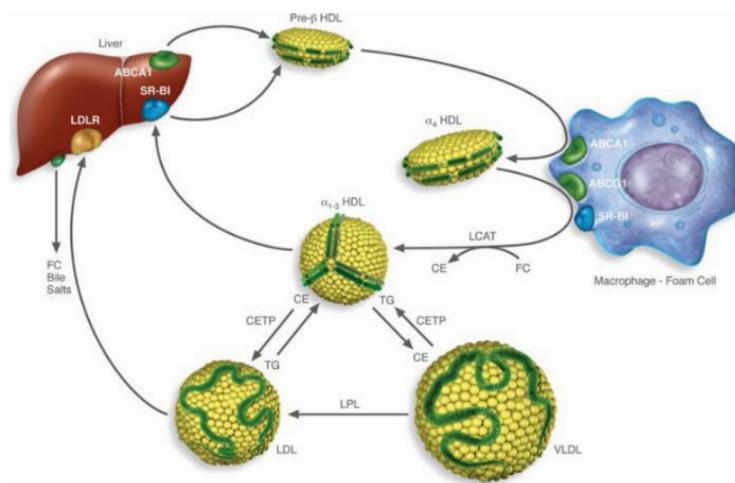
### Le transport inverse du cholestérol

Le transport inverse du cholestérol fait référence au processus au cours duquel les HDLs extraient le cholestérol excédentaire des cellules périphériques, y compris dans les macrophages,

le transportent dans la circulation sanguine et le livrent au foie, qui le transformera par la suite en acides biliaires pour être sécrétés dans la lumière intestinale et en partie éliminés dans les fèces. L'efflux de cholestérol cellulaire peut se faire autant par des processus actifs, incluant des transporteurs consommant de l'ATP, ou de façon passive comme la diffusion aqueuse. La quantité de cholestérol qui quittera la cellule dépend de plusieurs facteurs, dont le niveau des réserves de cholestérol cellulaire et l'activité des transporteurs membranaires, ainsi que la nature des accepteurs extracellulaires (48, 49).

La **Figure 5** (page 24) présente une schématisation du rôle des HDLs dans le transport inverse du cholestérol. Une augmentation de la quantité de cholestérol intracellulaire entraîne l'induction de l'expression des transporteurs membranaires *ATP-binding cassette transporter A1* et *G1* (ABCA1 / ABCG1), ainsi qu'une migration du cholestérol vers la membrane plasmique. Ces 2 protéines ont chacune une préférence pour un accepteur de cholestérol : ABCA1 a une plus grande affinité pour les apo A-I libres ou très peu "lipidées", tandis qu'ABCG1 transfère des lipides aux HDLs préformées et contenant plus de lipides (34, 48, 49). L'accumulation de cholestérol estérifié dans les HDLs suite à leur interaction avec ABCA1/ABCG1 entraîne une transformation des lipoprotéines, qui évoluent vers les HDL<sub>2</sub>. Le cholestérol ainsi collecté est transporté dans la circulation sanguine et est finalement déchargé au foie par la liaison des HDLs à leur récepteur, SR-B1, qui permet de transférer les lipides hydrophobes sans que la lipoprotéine complète n'ait à être internalisée puis dégradée (50). Une fois sélectivement libérés de leurs esters de cholestérol, les HDLs retournent dans la circulation et perpétuent le cycle.

**Figure 5.** Le transport inverse du cholestérol



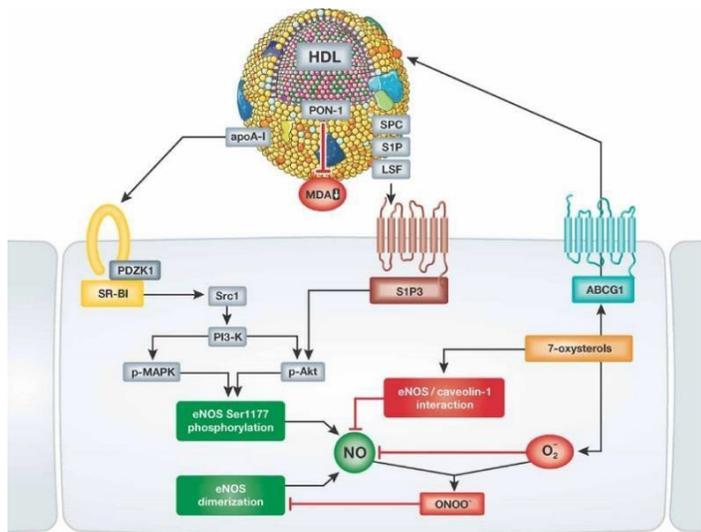
Tiré de Remaley 2014 (51) (Reproduit avec permission)

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1, ABCG1 : ATP-binding cassette transporter G1, CE : Cholestérol estérifié, CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*, FC : Cholestérol libre, LCAT : *Lecithin/cholesterol acyltransferase*, LDL : Lipoprotéine de faible densité, LDLR : Récepteur à LDL, LPL : Lipoprotéine lipase, SR-B1 : *Scavenger receptor type B member 1*, TG : Triglycérides, VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

### Anti-hypertenseur

Les HDLs participent à la régulation de la pression artérielle en augmentant la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO), un gaz vasodilatateur synthétisé par l'enzyme *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS). Les HDLs peuvent activer cette enzyme, ou lever son inhibition, par l'intermédiaire de 3 voies cellulaires : i) la voie du récepteur endothélial SR-B1; ii) la voie des récepteurs de S1P (S1P<sub>1</sub> et S1P<sub>3</sub>); et iii) par l'efflux de certains oxystérols à travers ABCA1, tel que présenté à la **Figure 6** (page 25). Les HDLs agissent également au niveau du NO directement, en le protégeant des radicaux superoxydes, qui sont reconnus pour en diminuer la biodisponibilité (52).

**Figure 6.** Mécanismes antihypertenseurs des HDLs



Tiré de Besler 2012 (53) (Reproduit avec permission)

ABCG1 : *ATP-binding cassette transporter G1*, Akt : Protéine kinase B, Apo : Apolipoprotéine, eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*, MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*, MDA : Malondialdéhyde, NO : Oxyde nitrique, PI-3K : Phosphatidylinositol 3-kinase, PON1 : *Serum paraoxonase/arylesterase 1*, S1P : Sphingosine-1-phosphate, S1P3 : récepteur à S1P, Ser : Sérine, SR-B1 : *Scavenger receptor type B member 1*

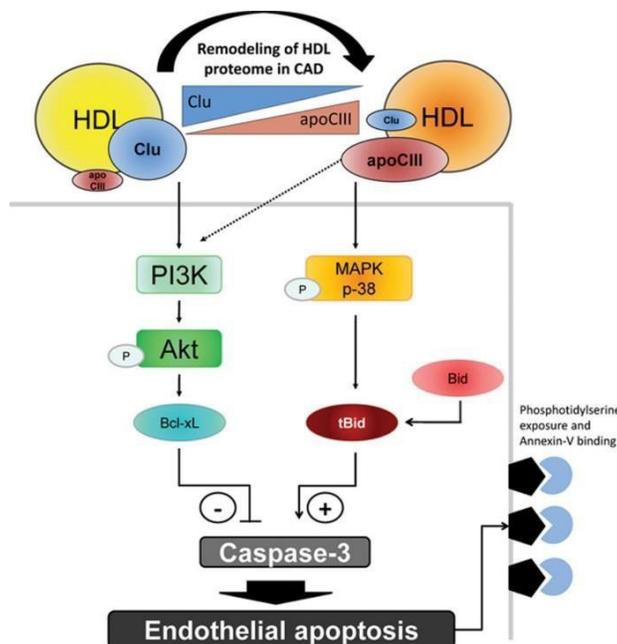
La voie du SR-B1 inclut l'activation en chaîne de la Src tyrosine kinase, *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI-3K), *protein kinase B* (Akt), et *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), qui phosphorylent eNOS, ce qui l'active et augmente la production de NO (40). La liaison de S1P à ses récepteurs entraîne, entre autres, une mobilisation cellulaire du calcium, qui se lie à la calmoduline; ensemble, ils diminuent l'inhibition d'eNOS par la cavéoline (non représenté sur la Figure 5) (54). La liaison de S1P à son récepteur entraîne aussi une phosphorylation activatrice d'eNOS par Akt. Finalement, certains oxystérols, comme le 7-kétocholestérol, ont la capacité d'inhiber eNOS. Leur efflux vers les HDLs, par ABCA1 ou ABCG1, lève cette inhibition et augmente la quantité de NO synthétisé (54).

### Anti-apoptotique

Les HDLs protègent les cellules endothéliales contre l'apoptose induite par plusieurs facteurs, dont la lipotoxicité (accumulation de cholestérol libre ou de LDL oxydé [oxLDL]), les protéines du complément et le TNF- $\alpha$  (55, 56). Les HDLs préviennent ou amoindrissent la lipotoxicité en

favorisant l'efflux du cholestérol et des lipides oxydés par les mécanismes préalablement discutés. De plus, elles inhibent l'activité pro-apoptotique des caspases 3 et 9 en entraînant leur phosphorylation par Akt, tel que présenté à la **Figure 7** (page 26) (42). La présence de clusterine dans les HDLs pourrait initier cette voie de signalisation spécifique (57). Finalement, les HDLs limitent la production cellulaire d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène (en diminuant l'activité de la cascade de phosphorylation oxydative), elles préservent l'intégrité de la mitochondrie (ce qui limite la sécrétion de cytochrome c qui induit l'apoptose) (42), réduisent la fragmentation de l'ADN nucléaire, et interrompent les voies de signalisation cytotoxiques impliquant le calcium. Il y aurait une corrélation positive entre le ratio molaire de S1P/ SM et le pouvoir anti-apoptotique des HDLs (58).

**Figure 7.** Voie de signalisation cellulaire impliquée dans la prévention de l'apoptose par les HDLs



Tiré de Riwanto 2013 (57) (Reproduit avec permission)

Akt : Protéine kinase B, Apo: Apolipoprotéine, CAD: *Coronary artery disease*, Clu : Clusterine (Apo J), PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase, MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

## **Anti-inflammatoire**

Les HDLs sont reconnues comme anti-inflammatoires parce qu'elles diminuent l'expression par les cellules endothéliales d'*intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, *vascular adhesion molecule 1 (VCAM-1)*, d'*endothelial-selectin (e-selectin)* et de *monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1)* des molécules favorisant le chimiotactisme, soit la première étape de l'athérosclérose (59, 60). Cet effet serait lié à la présence de l'Apo A-I, mais aussi à celle des phospholipides sur les HDLs (61). La réduction d'ICAM-1 et VCAM-1 peut être induite par 2 voies indépendantes : i) par l'activation des récepteurs de SR-B1 et S1P, les HDLs augmentent l'activité de 2 enzymes anti-inflammatoires, la 24-déhydrocholestérol réductase et l'hème oxygénase; et ii) en inhibant la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B, normalement induite par TNF- $\alpha$  (58). L'Apo E pourrait aussi participer à la diminution de l'infiltration de neutrophiles et monocytes dans la paroi artérielle en réduisant l'expression de l'intégrine CD11b à la surface des monocytes (62).

## **Antioxydant**

Les HDLs protègent les LDLs contre l'oxydation, en plus d'inactiver leurs composantes oxydées. Plusieurs protéines participent à cette activité, dont la *serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1)*, la *serum paraoxonase/lactonase 3 (PON3)*, la *platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)*, l'Apo F, l'Apo J, l'Apo L-1 et la PLTP. Bien que toutes les classes de HDL soient antioxydantes, ce sont les HDL<sub>3</sub> qui sont les plus puissantes à ce niveau(34).

Les HDLs s'opposent à l'action de plusieurs sortes d'agents oxydants comme les oxLDLs pouvant contenir des hydroperoxydes lipidiques (LOOH), ou comme les phospholipides à chaînes courtes oxydées (oxPL) et les stérols oxydés. Chaque classe de peroxydes est traitée par son agent antioxydant spécifique. Par exemple, l'Apo A-I est particulièrement efficace pour inactiver les LOOH, tandis que PON1, LCAT et PAF-AH agissent plus fortement sur les oxPL, qu'elles transforment en lysophosphatidylcholine (lysoPC) (63, 64). En éliminant les lipides peroxydés, les HDLs mettent fin à la réaction de peroxydation en chaîne. Ce processus comprend deux étapes : le transfert des peroxydes lipidiques (LOOH) des LDLs aux HDLs, suivi par leur réduction à la forme hydroxyde (LOH), qui est inactive au niveau de l'oxydo-réduction (65, 66).

L'efficacité du transfert des lipides dépend de la fluidité membranaire des HDLs. Celle-ci est inversement proportionnelle à 3 ratios : i) le ratio de sphingomyéline / phosphatidylcholine (SM/PC) ; ii) le ratio de cholestérol libre / phospholipides (CL/PL) ; et iii) le ratio d'acides gras saturés / les acides gras polyinsaturés (AGS/AGPI) (64). En effet, une plus grande quantité de cholestérol libre, d'acides gras saturés ou de sphingomyéline ont tendance à rendre la membrane plus rigide, ce qui retarde le transfert des lipides, tandis que la phosphatidylcholine, les phospholipides et les acides gras polyinsaturés facilitent le passage des lipides. En étant situés sur la surface des lipoprotéines, les phospholipides oxydés sont plus facilement éliminés par les HDLs, à l'inverse des esters de cholestérol oxydés qui sont cachés dans le centre hydrophobe des lipoprotéines. Le transfert des LOOH des LDLs aux HDLs peut se faire de façon spontanée entre les membranes des lipoprotéines, ou peut impliquer un transporteur de lipides comme CETP.

La réduction (LOOH → LOH) est réalisée au niveau des résidus méthionine 112 et 148 de l'apo A-I lorsque ces sites ne sont pas oxydés, en quel cas ils deviennent non-fonctionnels (64). L'Apo A-I n'est pas la seule apolipoprotéine des HDLs qui possède un caractère antioxydant. L'Apo E, l'Apo J et l'Apo A-IV jouent toutes un rôle dans l'équilibre radicalaire. L'Apo J protège les LDLs contre l'oxydation par les cellules des parois vasculaires (67). Son action serait potentiellement liée à ses domaines de liaison hydrophobiques, qui aideraient à maintenir l'intégrité des lipoprotéines.

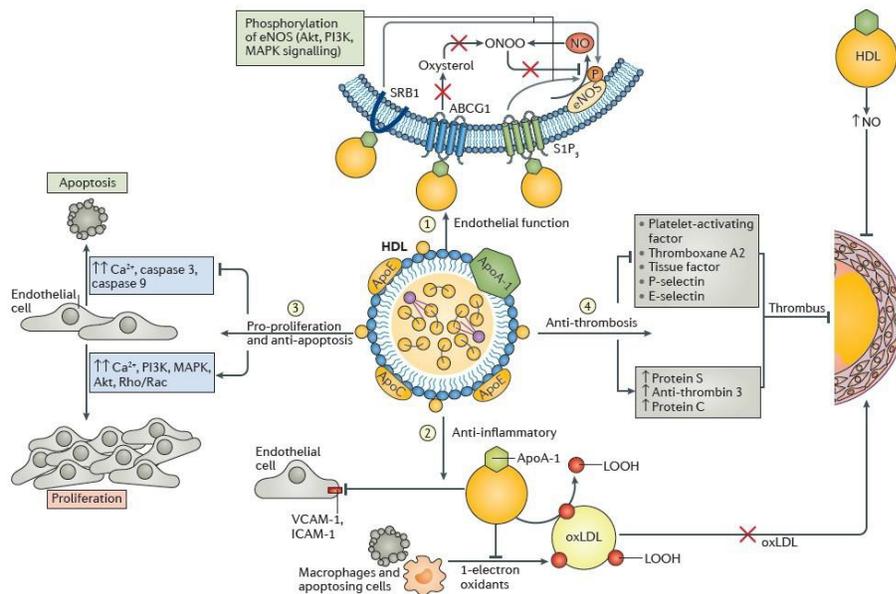
Outre les apolipoprotéines, l'action antioxydante des HDLs est aussi partiellement effectuée par certaines enzymes comme PON1, PAF-AH et LCAT, qui hydrolysent les phospholipides oxydés à chaînes courtes (oxPL), mais ne sont pas très efficaces pour inactiver les LOOH. On commence à remettre en doute la capacité de PON1 à agir sur les oxPL : son action antioxydante impliquerait un autre mécanisme. Finalement, les HDLs transportent des quantités minimales d'antioxydants lipophiles, surtout les tocophérols, qui pourraient participer à l'activité antioxydante totale (64).

### **Anti-thrombotique**

Les HDLs préviennent la formation de thrombus à plusieurs niveaux, soit en prévenant l'agrégation plaquettaire, en régulant la cascade de coagulation (inhibition des facteurs de coagulation X, Va, et VIIIa) (58), en prolongeant le temps de prothrombine et en promouvant

la dégradation des caillots de fibrine. L'activation et l'agrégation des plaquettes sont inhibées par l'expression de la prostacycline PGI<sub>2</sub> et du NO, ainsi que par l'action de la *platelet-activating factor acetylhydrolase* (PAF-AH) qui, comme son nom l'indique, hydrolyse le facteur d'activation des plaquettes (40). Les HDLs retardent la formation des caillots en inhibant la transformation de prothrombine en thrombine, la protéine responsable du clivage du fibrinogène en fibrine, le principal constituant des caillots. Finalement, elles stimulent la génération de plasmine, un facteur clé de la fibrinolyse (40, 55, 68, 69). (**Figure 8**, page 29)

**Figure 8.** Représentation des fonctions anti-hypertensive, anti-apoptotique, anti-inflammatoire et anti-thrombotique des HDLs



Tiré de Vaziri 2016 (70) (Reproduit avec permission)

ABCG1 : *ATP-binding cassette transporter G1*, Akt: Protéine kinase B, Apo : Apolipoprotéine, Ca : Calcium, eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*, ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*, LOH : Hydroxyde lipidique, LOOH : Hydroperoxyde lipidique, MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*, NO : Oxyde nitrique, oxLDL : LDL oxydé, PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase, S1P3 : Récepteur à S1P, VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*, SRB1 : *Scavenger receptor type B member 1*

## Les dysfonctions des HDLs rapportées en condition pathologique

Les HDLs peuvent être la cible d'oxydation enzymatique, de lipolyse et de protéolyse, toutes des modifications qui affectent directement leur fonctionnalité. Par exemple, la myéloperoxydase, une composante des macrophages présents dans les parois artérielles, est connue pour oxyder l'Apo A-I et la rendre inapte à activer ABCA1 pour promouvoir l'efflux de cholestérol. Spécifiquement, c'est la chloration sur la tyrosine en position 192, combinée à l'oxydation de la méthionine, qui est responsable de cet effet (71). La phospholipase A2, pour sa part, inhibe l'efflux de cholestérol médié par les HDLs en hydrolysant la phosphatidylcholine, sans affecter l'Apo A-I. Plusieurs protéases attaquent les HDLs en dégradant l'Apo A-I et forment des protéines tronquées au niveau du groupe carboxyle terminal. Il a été démontré que, lorsque les résidus en position 220-231 sont perdus en même temps que le groupe carboxyle terminal, les HDLs ne peuvent plus lier ABCA1 (48, 72).

Les HDLs sont de plus en plus étudiées au niveau de leur fonctionnalité en condition pathologique. La diversité des combinaisons de pathologies, de fonctions étudiées et des causes potentielles des dysfonctions rend difficile de tirer une conclusion claire, et impossible de généraliser. Ce qui est certain, c'est que les conditions pathologiques sont presque toutes accompagnées d'une modification de la composition et/ou de la fonction des HDLs.

Le **Tableau I** (pages 31-33) présente quelques atteintes des HDLs isolées de sujets présentant diverses pathologies. Le lecteur remarquera qu'aucune étude n'a caractérisé les HDLs de façon complète, c'est-à-dire évaluer sa composition globale, puis son protéome (incluant les modifications post-traductionnelles), son lipidome (ainsi que la présence d'espèces lipidiques oxydées), et finalement testé sa fonctionnalité au niveau de ses capacités antioxydante, anti-inflammatoire, et à promouvoir l'efflux de cholestérol et la synthèse de NO. Il remarquera également la prédominance des maladies auto-immunes et cardiovasculaires parmi les conditions étudiées, qui n'est pas due à une sélection spécifique, mais représente bien l'état de la littérature actuelle.

**Tableau I.** Compilation non-exhaustive des études de la composition des HDLs, ainsi que leur fonctionnalité en condition pathologique

<b>Fonction(s) altérée(s)</b>	<b>Pathologie</b>	<b>Mécanismes touchant les HDLs</b>	<b>Autres mécanismes</b>	<b>Référence</b>
<b>Antioxydante</b> <b>Anti-inflammatoire</b> <b>Efflux de cholestérol</b>	Syndrome coronarien aigu	↓ activité de PON1 liée aux HDLs ↑ hydroperoxydes lipidiques Expression différente de 48 protéines	-	(73)
<b>Antioxydante</b>	Diabète décompensé	-	↓ activité PON1 plasmatique	(74)
<b>Antioxydante</b>  -	Lupus érythémateux (femmes seulement)  Diabète de type 1 (hommes seulement)	↓ PON3  ↓ Apo E, PLTP, Apo J	-	(75)
<b>Antioxydante</b>	Maladie cardiovasculaire	↑ diamètre des HDLs Relâche de l'Apo A-I	Capacité préservée à promouvoir l'efflux de cholestérol	(76)
<b>Antioxydante</b> <b>Efflux de cholestérol</b>	Diabète de type 1	117 des 174 protéines identifiées en LC-MS/MS présentent des modifications post-traductionnelles (oxydation, désamination, Amadori, allysine, chlorotyrosine, nitrotyrosine)	Activité de la PON1 normale	(77)
<b>Antioxydante</b> <b>Anti-inflammatoire</b>	Diabète de type 2	↑ acides gras oxydés dans les HDLs (12-HETE, 15-HETE, 5-HETE, 9-HODE, 13-HODE)	↑ SAA plasmatique	(78)

<b>Antioxydante Anti-inflammatoire</b>	Psoriasis	↑ MDA dans les HDL <sub>3</sub>	↓ activité plasmatique de PON1	(79)
<b>Anti-inflammatoire</b>	Insuffisance rénale chronique	↑ SAA	-	(59)
<b>Anti-inflammatoire</b>	Arthrite rhumatoïde	↑ protéines de phase aiguë (SAA, fibrinogène, apo J, haptoglobine) ↓ PON1	-	(80)
<b>Anti-inflammatoire</b>	Lupus érythémateux	-	↑ IL-6 et TNF-α ↓ induction ARNm d'ATF3	(81)
<b>Antihypertenseur</b>	Insuffisance cardiaque chronique	↑ MDA dans les HDLs ↓ activité de PON1 liée aux HDLs	↓ phosphorylation d'eNOS à Ser <sup>1177</sup> * ↑ phosphorylation d'eNOS à Thr <sup>495</sup> ** ↑ peroxydes lipidiques circulants	(82)
<b>Antihypertenseur</b>	Obésité (pédiatrie)	-	↓ phosphorylation d'eNOS à Ser <sup>1177</sup> * ↑ phosphorylation d'eNOS à Thr <sup>495</sup> **	(83)
<b>Antihypertenseur Efflux de cholestérol</b>	Insuffisance rénale chronique	↑ diméthylarginine symétrique	Inhibition de la production de NO ↑ production de radicaux superoxydes ↑ VCAM-1	(52)

<b>Efflux de cholestérol</b>	Hyperglycémie	Glycation non enzymatique de l'Apo A-I, entraîne une activité réduite de la LCAT	-	(84)
<b>Efflux de cholestérol</b>	Psoriasis	↓ Apo A-I, Apo M et Apo F ↑ protéines de phase aiguë (SAA, prothrombine, α-2-HS-glycoprotéine, α-1-acid-glycoprotéine 1, haptoglobine, A1AT) ↑ Apo A-II ↓ CT, PC et SM	Capacité antioxydante préservée (↑ activité PAF-AH)	(85)
<b>Efflux de cholestérol</b>	Infection au VIH	↓ qté PON1 et PON3 ↓ activité PON1 et PON3 ↑ sphingomyéline	-	(86)
(n'a pas le pouvoir statistique pour confirmer une différence au niveau de l'efflux de cholestérol)	Insuffisance rénale chronique sous hémodialyse	↑ A1AT, Apo A-IV, Apo C-II, Apo C-III, HPR, SAA1 et transthyrétine ↓ apo A-I, Apo A-II, Apo L-1, Apo M, PCYOX, PON1	-	(87)
<b>Anti-apoptotique</b>	Maladie coronarienne stable et syndrome coronarien aigu	↓ Apo J ↑ Apo C-III	↓ activation de Bcl-xL ↑ activation tBid ↓ inhibition de la caspase-3	(57)

A1AT: alpha-1-antitrypsine, ARNm : ARN messenger, CT : cholestérol total, eNOS : *endothelial nitric oxide synthase*, HPR: *haptoglobin-related protein*, IL-6 : interleukine-6, MDA : malondialdéhyde, NO : oxyde nitrique, PAF-AH: *platelet-activating factor acetylhydrolase*, PC : phosphatidylcholine, PCYOX: Prénylcystéine oxydase, PLTP : *phospholipid transfer protein*, PON1 : *serum paraoxonase/arylesterase 1*, PON3 : *serum paraoxonase/lactonase 3*, qté : quantité, SAA: *serum amyloid A*, SM : sphingomyéline, TNF-α : *tumor necrosis factor α*, VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*, VIH : virus de l'immunodéficience humaine. \* la phosphorylation d'eNOS en position Ser<sup>1177</sup> a un effet activateur sur l'activité de l'enzyme, \*\* la phosphorylation d'eNOS en position Thr<sup>495</sup> a un effet inhibiteur sur l'activité de l'enzyme

Le champ d'étude étant relativement jeune, il manque de standardisation entre les études au niveau de la préparation des échantillons et des tests effectués. Bien que l'isolation des lipoprotéines par ultracentrifugation à gradient de densité soit encore la technique de référence, plusieurs équipes travaillent avec l'isolation par précipitation de l'Apo B ou par FPLC par exemple. Les densités utilisées pour caractériser les HDLs ne font pas non plus l'unanimité, tout comme le nombre de sous-fraction à distinguer (HDLs totales, HDL<sub>2</sub> / HDL<sub>3</sub>, ou HDL<sub>2a</sub> / HDL<sub>2b</sub> / HDL<sub>3a</sub> / HDL<sub>3b</sub> / HDL<sub>3c</sub>). Finalement, les moyens employés pour décrire les HDLs dépendent des préférences individuelles des laboratoires, c'est ainsi qu'on peut évaluer leur capacité antioxydante, par exemple, selon la quantité de malondialdéhyde (MDA), de *Thiobarbituric acid reactive species* (TBARS) ou d'hydroperoxydes lipidiques sur les HDLs, avec un test de fluorescence n'utilisant pas de cellules (DCFH-DA), avec un essai fonctionnel utilisant des cellules, en suivant la formation de diènes lors d'une incubation avec du cuivre, selon l'activité de l'enzyme PON1 liée aux HDLs, etc. Les résultats ainsi obtenus sont difficilement comparables et rarement répétés.

## **Les HDLs dans le cancer**

Les HDLs sont très étudiées en lien avec le risque de développer un cancer, mais très peu étudiées en situation de cancer actif, et encore moins chez les survivants de cancers. De plus, lorsqu'elles sont étudiées, on se limite souvent à mentionner les niveaux de HDL-C. Les informations sur la composition et la fonctionnalité des HDLs sont très rares.

### **Cancers actifs**

Une faiblesse récurrente des études rapportant un HDL-C bas chez des patients avec un cancer est qu'elles sont transversales, et qu'il est donc impossible de statuer sur la chronologie des événements : l'abaissement des niveaux de HDL-C est-il antérieur au diagnostic, ou est-ce que le processus cancéreux est responsable de cette diminution? Étant donné que les informations sur le parcours médical des sujets ne sont pratiquement jamais mentionnées, il n'est pas possible de savoir si les résultats se rapportent au moment du diagnostic, ou si quelques cycles de chimiothérapie ou de radiothérapie pourraient avoir eu un effet sur la variable d'intérêt. Finalement, il n'y a pas de littérature qui permette de savoir si la rémission d'un cancer

est accompagnée d'un rétablissement du bilan lipidique ou si les atteintes sont permanentes. Certains groupes ont néanmoins investigué quelques aspects intéressants concernant les HDLs en situation de cancer. Par exemple, un groupe a examiné la répartition des lipoprotéines HDL (HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub>) chez des patients au moment du diagnostic d'un néoplasme (aucune précision sur les types de cancers n'a été donnée) (88). Les patients n'avaient donc pas reçu de traitement, sous quelque forme que ce soit. Les niveaux de HDL-C étaient particulièrement abaissés chez les patients comparativement aux contrôles. Ils présentaient aussi une inversion du ratio HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> : alors que les sujets sains avaient plus de HDL<sub>3</sub> que de HDL<sub>2</sub>, les sujets avec cancer avaient plus de HDL<sub>2</sub> et peu de HDL<sub>3</sub>. Les auteurs ne pouvaient pas se prononcer sur la causalité de leurs observations : est-ce que ces anomalies sont responsables du développement du cancer, ou est-ce que le cancer a causé ces anomalies? L'effet physiologique d'un tel déséquilibre n'a pas non plus été investigué, que ce soit au niveau de la capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol ou au niveau de la capacité antioxydante, pour laquelle les HDL<sub>3</sub> semblent très puissantes. L'effet des traitements anti-cancéreux sur le ratio HDL<sub>2</sub>/HDL<sub>3</sub> n'a pas non plus été couvert puisque les patients ont été enrôlés au moment du diagnostic et l'étude était de devis transversal.

L'équipe du Dr Huang (89) a étudié le rôle des HDLs dans le processus métastatique. Les HDLs de patientes souffrant d'un cancer du sein compliqué par un diabète de type 2 accélèrent ce processus métastatique en faisant exprimer ICAM-1 et VCAM-1 sur les cellules périphériques, ce qui augmente l'adhésion des cellules cancéreuses à de nouveaux foyers. Ces HDLs présentaient aussi un niveau d'oxydation élevé, tel que démontré par une plus grande concentration de TBARs dans les lipoprotéines. Par contre, les auteurs n'ont pas indiqué si les patientes avaient été recrutées au moment de leur diagnostic ou si elles avaient déjà reçu des traitements (est-ce que la chimiothérapie ou la radiothérapie pourraient avoir joué un rôle dans le dysfonctionnement des HDLs?). Les HDLs en soi n'ont pas non plus été investiguées au niveau de leur composition. Le fait que les patientes avec un diabète avaient un HDL-C abaissé n'a pas non plus été discuté.

Dans une investigation sur le cancer du sein, Alacacioglu et collègues (90), ont évalué le statut antioxydant de patientes traitées avec une thérapie adjuvante d'anthracyclines. Les niveaux de HDL-C n'ont pas varié entre le début et la fin des traitements, mais l'absence de

groupe contrôle ne permet pas de statuer sur une diminution éventuelle par rapport à la population sans cancer. Le statut reproducteur des patientes (ménopause) n'est pas non plus précisé, alors qu'il peut avoir un effet sur les HDLs. Le statut oxydatif a été évalué selon les niveaux de TBARS sériques (augmentés) et l'activité de la SOD (diminuée), qui n'est pas liée aux HDLs : on ne sait donc pas si les HDLs ont conservé leur potentiel antioxydant ou si elles ont été affectées par la chimiothérapie.

Dogantekin et collègues (91) ont examiné les paramètres de stress oxydant ainsi que la défense antioxydante chez des patients dont la chimiothérapie a entraîné une neutropénie, pour les comparer aux niveaux suite à la résolution de la neutropénie (encore une fois, aucune information sur les types de cancers n'a été donnée). Les niveaux de HDL-C et de PON1 étaient plus élevés pendant la neutropénie qu'après la résolution. Inversement, les niveaux de MDA ont augmenté lors de la résolution. Néanmoins, il faut considérer ces résultats avec une certaine réserve, car cette étude comporte plusieurs faiblesses, notamment un flou scientifique au niveau de PON1, les auteurs présentant des résultats de « niveaux » de PON1 alors qu'ils décrivent avoir mesuré son activité. Il y a une différence importante entre la quantité protéique d'une enzyme et son activité. De plus, la discussion est de faible qualité et est concentrée sur le MDA, sans offrir d'explication pour les variations de HDL-C et de PON1. Faridvand (92) a également observé une diminution de l'activité de PON1 sérique, cette fois chez des patients venant tout juste d'être diagnostiqué avec un myélome multiple de stade 1. Les niveaux de HDL-C étaient également abaissés dans cette population, mais aucune investigation supplémentaire n'a été faite sur le sujet. Les auteurs expliquent la diminution de l'activité de la PON1 par l'augmentation de la peroxydation lipidique, démontrée par des niveaux plus élevés de 8-isoprostane sérique, et qui est connue pour inhiber PON1.

Dieli-Conwright (93) a évalué l'effet de la chimiothérapie sur les composantes du MetS chez des femmes ayant un cancer du sein de stade 1 à 3. Il est intéressant de noter que le statut reproducteur a été considéré, avec environ la moitié des femmes en pré-ménopause et l'autre moitié en post-ménopause. Aucune des participantes ne présentait de MetS à l'inclusion, mais suite à une moyenne de 15 semaines de chimiothérapie adjuvante, 72.5% des participantes avaient développé le MetS. Chacun des critères, analysé individuellement, a empiré chez les participantes. Les niveaux de HDL-C ont diminué d'environ 10% en moyenne suite à la

chimiothérapie. Cette étude observationnelle est intéressante car elle démontre que les changements peuvent se produire très rapidement, mais elle n'offre aucune explication sur les raisons de cette dégradation de l'état clinique. Quelques mécanismes associés à la baisse des niveaux de HDL-C chez des femmes traitées par chimiothérapie pour un cancer du sein ont été élucidés par l'équipe de Sharma (94). Il est à noter que les effets sont spécifiques à chaque agent, et que la combinaison des agents est responsable du tableau clinique final observé. Ces mécanismes incluent, entre autres, la diminution de l'expression d'ABCA1 par les cellules hépatiques (expliquée par une diminution de l'expression protéique du récepteur nucléaire qui en promeut la synthèse, PPAR $\gamma$ ) et une synthèse diminuée d'Apo A-I. L'inhibition de l'expression d'ABCA1 limite l'efflux de cholestérol au HDL sans que celui-ci soit nécessairement dysfonctionnel, ce qui n'exclut pas qu'il le soit également.

Les traitements de chimiothérapie ont été étudiés au niveau de leur effet sur l'activité de PON1 purifiée par l'équipe d'Alim (95). Quatre agents ont été investigués et, bien que les mécanismes d'action diffèrent, toutes les molécules testées avaient pour effet de diminuer l'activité de PON1. Une telle diminution de l'activité de PON1 a été rapportée dans de nombreux types de cancers. Une diminution de l'activité de PON1 liée aux HDLs peut affecter leur capacité antioxydante, mais ne donne pas d'indication sur leur potentiel antioxydant global puisqu'elles agissent par de nombreuses voies, dont certaines sont indépendantes de PON1. Simplement étudier PON1 ne donne que des informations partielles sur la défense antioxydante totale.

Les études présentées ont chacune leurs forces et leurs faiblesses, mais quelques faiblesses sont récurrentes, comme l'absence d'un groupe contrôle, le manque d'informations sur les participants et leur diagnostic, le peu d'importance accordé aux variations des niveaux de HDL-C, ainsi que l'absence d'investigation au niveau de la composition générale (TG, CE, CL, PL, et protéines), du lipidome et du protéome des HDLs. Une grande variabilité dans les résultats peut aussi être introduite par le fait que certaines études visaient « le cancer » sans précision, donc représentent un amalgame de pathologies, de régimes de traitements et d'effets cliniques variés. Finalement, le fait que le cancer du sein représente la majorité des études citées ici pourrait introduire un biais, car les résultats rapportés ne concernent que des femmes. Une autre faille énorme de ce champ d'étude vient du fait que les participants sont tous des adultes.

Il n'y a aucune information disponible sur les cancers en pédiatrie, alors qu'on ne peut pas extrapoler les résultats des adultes aux enfants car les pathologies sont trop différentes.

Au niveau de l'effet de la leucémie sur les HDLs, les connaissances sont très limitées. Comme pour plusieurs cancers, un niveau abaissé de HDL-C a été rapporté au diagnostic, mais plusieurs particularités de ce cancer pourraient influencer l'évolution de ces niveaux. Par exemple, la leucémie est particulièrement fréquente en pédiatrie (comme mentionné précédemment, il n'y a pas de littérature sur les HDLs dans le cancer pédiatrique), et les traitements peuvent inclure de la radiothérapie, qui n'a jamais été spécifiquement étudiée pour son effet sur les HDLs.

## **Survivants de cancer**

L'étude de la santé métabolique des survivants de cancer a commencé il y a quelques années seulement. Pour l'instant, les marqueurs les plus utilisés sont la prévalence du syndrome métabolique (incluant ou non une diminution du HDL-C), ainsi que la santé cardiovasculaire.

Gunn et son équipe (28) ont tenté d'évaluer la prévalence du syndrome métabolique (MetS) dans une population de survivants de cancers pédiatriques (tous diagnostics inclus), dont 42% avaient souffert d'une leucémie. Comme le MetS n'est pas défini en population pédiatrique, les auteurs ont évalué les critères individuellement, ce qui permet d'avoir des informations sur la prévalence du HDL-C bas. Par contre, pour des raisons logistiques, le bilan lipidique n'était disponible que pour 26,1% de la cohorte (72 sujets, dont 46 ont reçu de la radiothérapie crânienne). Un niveau de HDL-C bas était la première cause de dyslipidémie, présente chez 21 (29%) des patients dont le bilan lipidique était disponible. Oudin et al (96) rapportent un taux un peu plus élevé de HDL-C abaissé, soit 36%, dans une cohorte de taille plus appréciable (n=170) composée de survivants de leucémie pédiatrique ayant été traités avec une greffe de cellules souches hématopoïétiques, qui est connue pour avoir des effets tardifs importants. Le temps écoulé depuis la greffe a un impact important sur l'incidence de HDL-C bas : Novetsky Friedman (97) a observé une forte augmentation de l'incidence cumulative de ce désordre, de 26.8% 5 ans après la procédure, à 52.0% 10 ans post-greffe.

Le groupe de Giordano (98) est le premier à investiguer les risques cardiovasculaires chez des survivants de LLA encore d'âge pédiatrique. Elle rapporte un taux de HDL-C inférieur

chez les patients comparativement aux contrôles, mais on ne sait pas si les niveaux seraient classifiés comme « bas ». Elle se distingue aussi au niveau de la définition de « survivants »: les participants étaient admissibles à partir de 3 mois après leur dernier traitement, alors que la plupart des groupes attendaient au moins 2 ans depuis la fin des traitements, ou 5 ans depuis le diagnostic.

Parmi ces études, la notion de HDL-C bas n'est qu'un critère du syndrome métabolique parmi les autres; aucun groupe ne s'est attardé à évaluer les causes et conséquences d'une telle diminution. La fonctionnalité des HDLs n'a pas non plus été regardée, alors qu'il est plausible de croire que les divers stress liés au cancer et à ses traitements pourraient occasionner des changements délétères aux lipoprotéines, au même titre que les maladies cardiovasculaires, rénales ou auto-immunes.

En résumé, les survivants de cancers pédiatriques vivent de nombreux effets secondaires, dont les causes peuvent être multiples et ne sont pas encore toutes identifiées. Parmi les effets secondaires récurrents, une diminution conséquente des niveaux de HDL-C augmente les probabilités de développer une maladie cardiovasculaire chez les survivants. Outre l'effet observé sur les niveaux circulants de HDL-C, on ne connaît pas l'impact du cancer, ni de ses traitements, sur la composition générale et particulièrement sur le protéome des HDLs. De plus, étant donné la part primordiale que jouent les HDLs dans le maintien de l'homéostasie, un dysfonctionnement pourrait résulter en une condition sérieuse. Plusieurs pathologies ont été identifiées comme altérant les HDLs, mais le cancer ne fait pas partie de ces cas de figure étudiés. Nous avons voulu, dans ce travail, caractériser les HDLs isolées des survivants de la LLA pédiatrique, et investiguer leur fonctionnalité afin de déceler toute atteinte pouvant affecter le futur de ces sujets.

## Chapitre 2 : Objectifs

L'objectif principal de ce travail de maîtrise est de caractériser la composition et la fonction des HDLs chez des survivants de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique afin d'identifier les différences entre les sujets métaboliquement non sains et les sujets sains.

Le premier sous-objectif vise l'évaluation de la composition globale des HDLs des survivants, exprimée en pourcentage de protéines, phospholipides, cholestérol libre et cholestérol estérifié.

Le deuxième sous-objectif vise à caractériser plus précisément la composition protéique des HDLs des survivants.

Le premier sous-sous-objectif vise l'identification individuelle de toutes les protéines présentes sur les HDLs. La comparaison des protéines présentes sur les HDLs des sujets sains et sur les HDLs des survivants permettra d'identifier les protéines qui ne sont présentes qu'en condition pathologique.

Le deuxième sous-sous-objectif vise la quantification de l'expression individuelle des protéines, afin d'identifier celles qui sont sous-exprimées ou surexprimées chez les survivants par rapport aux sujets sains.

Le troisième sous-objectif vise l'évaluation de la fonctionnalité des HDLs des survivants.

Le premier sous-sous-objectif vise l'évaluation de la capacité des HDLs des survivants à promouvoir l'efflux de cholestérol.

Le deuxième sous-sous-objectif vise l'évaluation de la capacité antioxydante des HDLs des survivants.

## **Chapitre 3 : La protéomique des HDLs isolées de survivants de la LLA pédiatrique**

Les sous-objectifs 1 et 2 ont fait l'objet d'un article soumis au *Journal of Proteome Research*, dans lequel nous présentons la composition globale des HDLs (sous-objectif 1), ainsi que les résultats de l'analyse du protéome par spectrométrie de masse (sous-objectif 2).



# Submission Confirmation

[Print](#)

**Thank you for your submission**

**Submitted to**

Journal of Proteome Research

**Manuscript ID**

pr•2017•00202f

**Title**

Altered proteome of high•density lipoproteins from pediatric acute lymphoblastic leukemia survivors

**Authors**

Fournier, Maryse  
Bonneil, Eric  
Garofalo, Carole  
Grimard, Guy  
Laverdière, Caroline  
Krajcinovic, Maja  
Drouin, Simon  
Sinnott, Daniel  
Marcil, Valérie  
Levy, Emile

**Date Submitted**

09•Apr•2017

[Author Dashboard](#)

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

## Altered proteome of high-density lipoproteins from pediatric acute lymphoblastic leukemia survivors

Journal:	<i>Journal of Proteome Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fournier, Maryse; Université de Montréal, Nutrition Bonneil, Eric; Institute for Research in Immunology and Cancer Garofalo, Carole; Sainte-Justine UHC Research Centre Grimard, Guy; Université de Montréal, Department of Pediatrics; Sainte-Justine UHC Research Centre Laverdière, Caroline; Université de Montréal, Department of Pediatrics; Sainte-Justine UHC Research Centre Krajinovic, Maja; Université de Montréal, Department of Pediatrics; Sainte-Justine UHC Research Centre Drouin, Simon; Sainte-Justine UHC Research Centre Sinnott, Daniel; Université de Montréal, Department of Pediatrics; Sainte-Justine UHC Research Centre Marcil, Valérie; Université de Montréal, Department of Nutrition; Sainte-Justine UHC Research Centre Levy, Emile; Université de Montréal, Department of Nutrition; Sainte-Justine UHC Research Centre, GI-Nutrition Unit; Institute for Research in Immunology and Cancer

SCHOLARONE™  
Manuscripts

# Altered proteome of high-density lipoproteins from pediatric acute lymphoblastic leukemia survivors

Fournier M<sup>1,2</sup>, Bonneil E<sup>3</sup>, Carole Garofalo<sup>1</sup>, Guy Grimard<sup>4</sup>, Caroline Laverdière<sup>1,4</sup>, Maja Krajinovic<sup>1,4</sup>, Simon Drouin<sup>1</sup>, Daniel Sinnett<sup>1,4</sup>, Valérie Marcil<sup>1,2</sup> and Emile Levy<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Centre, Sainte-Justine University Hospital Health Center, Departments of <sup>2</sup>Nutrition and <sup>4</sup>Pediatrics, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5.

<sup>3</sup>Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

**Running Title:** HDL composition of leukemia survivors

**Address for correspondence:**

\*Dr. Emile Levy  
GI-Nutrition Unit  
CHU Sainte-Justine  
3175 Sainte-Catherine Road  
Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5  
Tel.: (514) 345-7783  
Fax: (514) 345-4999  
E-mail: [emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:emile.levy@recherche-ste-justine.qc.ca)

**Abbreviations:** ALL: Acute lymphoblastic leukemia, Apo: Apolipoprotein, BMI: Body mass index, CETP: Cholesteryl ester transfer protein, CRP: C-reactive protein, EC: Esterified cholesterol, FC: Free cholesterol, Gy: Gray, HDL: High-density lipoprotein, ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1, LC-MS/MS: Liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LCAT: Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase, LDL: Low-density lipoprotein, MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1, MDA: Malondialdehyde, OGTT: Oral glucose tolerance test, PL: Phospholipids, SAA: Serum amyloid A, TC: Total cholesterol, TG: Triglycerides, VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent malignancy in children. Although 5-year survival exceeds 90%, more than 65% of the survivors experience at least one severe complication, including the metabolic syndrome and cardiovascular diseases. A significant proportion of pediatric cancer survivors have reduced high-density lipoproteins cholesterol (HDL-C) levels, the causes of which remain unknown. HDLs are antioxidant, anti-inflammatory, anti-atherosclerotic and anti-thrombotic particles, primordial in maintaining cardiovascular health. Accordingly, studies on HDL functionality in diverse pathologies have revealed some important dysfunctions linked to an altered composition. Our objective was to characterize the composition of HDLs isolated from pediatric ALL survivors. HDLs from 8 metabolically healthy, 8 metabolically unhealthy and 8 age- and gender-matched controls were analyzed. HDLs from the survivors were depleted in cholesterol, while mass spectrometry analyses revealed an enrichment of pro-thrombotic and pro-inflammatory proteins in the HDLs of the metabolically unhealthy survivors. These results indicate an alteration in the lipid and protein composition of HDL from childhood ALL survivors with metabolic disorders. Although more work is needed to validate the functionality of these HDLs, the data seem relevant for survivor health given the detection of potential biomarkers related to HDL metabolism and functionality in cancer.

Keywords: Lipoproteins, HDL, cancer survivors, metabolic syndrome, proteomics

## INTRODUCTION

Childhood cancers are rare, representing only 0.5-1% of all the cancers diagnosed in Canada. Despite the remarkable overall survival rate (83%, 5-years post-diagnosis), cancer remains the first cause of death from illness in the pediatric population<sup>1</sup>. Leukemias are the most common pediatric malignancy (32%) with acute lymphoblastic leukemias (ALL) accounting for 80% of all leukemia cases<sup>1</sup>. The 5-year survival rate of ALL has risen from 0% in the 1950's<sup>2</sup> to the astounding level of 91%<sup>1</sup>. This was made possible with the use of intense regimens of effective but extremely toxic therapies. It is a rising concern to administer such dangerous treatments in a crucial developmental stage, which may affect the health of the young survivors many years later. Indeed, more than 65% of the childhood cancer survivors have at least one long-term complication, which are severe and often life-threatening<sup>3-6</sup>. One of these complications regularly found in cancer survivors is the metabolic syndrome, e.g. a cluster of obesity, insulin resistance, hypertension, and dyslipidemia. Its prevalence may vary from 6-55% in survivors, depending on many factors such as the age of onset, the type of cancer, the kind of treatments, the duration of follow-up and others<sup>7-8</sup>. In fact, hematologic cancer survivors are twice more likely to develop the metabolic syndrome than their siblings or the general population<sup>9-10</sup>.

HDL particles are widely known in view of their anti-atherosclerotic properties. These features are not only due to their ability to promote reverse cholesterol transport<sup>11</sup>, but are likely the result of many functions, which help maintain metabolic health because of their antioxidant<sup>12-13</sup>, anti-apoptotic<sup>14</sup>, anti-inflammatory<sup>15-17</sup>, anti-hypertensive<sup>18-19</sup> and anti-thrombotic<sup>20</sup> capacities. These numerous functions are made possible by the large variety of protein and lipid moieties within the HDL fraction. Intriguingly, very limited

information is available on the composition and functionality of HDL in ALL survivors even though the latter develop metabolic syndrome. Since proteomics allow high-throughput analyses for the detection, identification and functional investigation of proteome, it seems reasonable and appropriate to use this large-scale technique to scrutinize the variations of the multitude of proteins composing the HDL<sup>21</sup>. Not only did proteomics generally identify ~100 individual proteins as part of the HDL<sup>22</sup>, they also revealed dysfunctional HDLs in many pathologies, including kidney disease<sup>23-24</sup>, type 1 diabetes<sup>25-26</sup>, type 2 diabetes<sup>12</sup>, cardiovascular diseases<sup>18,27-29</sup>, lupus erythematosus<sup>30</sup> and rheumatoid arthritis<sup>9</sup>. When investigated, these dysfunctions were often linked to a change in the HDL's proteome such as a shift towards more inflammatory proteins<sup>16,24,27,28</sup> and post-translational modifications of the proteins<sup>26</sup>. HDLs in cancer survivors have not yet been studied, either for their global composition or proteomic diversity. Our objective was to describe the global HDL composition and further investigate the changes in the proteome of HDLs isolated from childhood ALL survivors.

## EXPERIMENTAL SECTION

### Study participants

Participants for this study were recruited as part of the PETALE initiative at the Sainte-Justine University Hospital Center (UHC) in Montreal. The PETALE program aims to identify biomarkers associated to the development of late effects in survivors of pediatric ALL. The PETALE cohort is comprised exclusively of childhood ALL survivors of European descent from the province of Québec. PETALE participants were diagnosed between 1987 and 2010, under 19 at diagnosis, and treated at Sainte-Justine University

Hospital Center (UHC) with the Dana-Farber Cancer Institute protocols<sup>31</sup>. Exclusion criteria included patients treated with hematopoietic stem cell transplantations, or those with leukemia relapses or secondary cancers<sup>32</sup>. Recruitment was held between January 2012 and September 2015. The study was approved by the Sainte-Justine UHC Institutional Review Board, and all interventions were carried out in respect of the Declaration of Helsinki. Written informed consent from the participant and/or the legal guardian was obtained prior to participation.

### Clinical, biochemical and anthropometric data

Height, weight and waist circumference were documented for every participant. BMI was calculated as weight divided by height squared ( $\text{Kg/m}^2$ ). Blood pressure was measured as per Hypertension Canada's guidelines<sup>33</sup>. Information on smoking habits was obtained from a self-reported questionnaire. The date of diagnostic, total radiotherapy dose and end-of-treatment date were collected directly from patients' charts. Age at diagnosis and event-free remission were then computed. Total cholesterol (TC), HDL-C and triglycerides (TG) were enzymatically determined with a Synchron LX®20 (Beckman Coulter, USA) using Beckman Instrument reagents. LDL-cholesterol (LDL-C) was calculated using the Friedewald equation<sup>34</sup>, while non-HDL-cholesterol (non-HDL-C) was defined as:  $\text{CT} - (\text{HDL-C})$ . Blood glucose was assessed with the glucose oxidase technique and insulin with an Access Immunoassay System (Beckman Coulter, USA). Finally, participants were submitted to an oral glucose tolerance test (OGTT), which evaluated their glycemic response to 75g glucose at 30, 60 and 120 minutes<sup>32</sup>. For this study, participants were classified as «metabolically healthy» (Healthy) or «metabolically unhealthy» (Unhealthy).

The Healthy subjects did not present any symptom of the metabolic syndrome, whereas the Unhealthy had at least a low HDL-C (<1.03 mmol/L for men, or <1.3 mmol/L for women)<sup>35</sup> with or without another metabolic disorder such as hypertension, obesity, dyslipidemia and glucose intolerance. Participants were individually selected in order to match them for age and gender with survivors displaying the opposite phenotype, which resulted in the identification of 8 pairs of healthy-unhealthy survivors, in addition to 8 control subjects for normal references.

## HDL isolation

Plasma HDLs were isolated as described in previous work<sup>36</sup>. Briefly, antecubital venous blood was obtained after an overnight fast in EDTA-coated tubes (1g EDTA/L). Plasma was separated from blood by a 20-min low-speed centrifugation at 4°C. BHT (0.01%) and sodium azide (NaN<sub>3</sub>, 0.01%) were added to preserve the samples. Total HDLs ( $\delta=1.09-1.21\text{g/ml}$ ) were isolated by density gradient ultracentrifugation using KBr and an Optima LE-80 ultracentrifuge (Beckman Coulter, USA) with a 70.1ti rotor (110 000g, 4°C, 48 h). Samples were desalted by a 24-h dialysis against a 0.15M NaCl- 0.3mM EDTA buffer (pH 7.4), and kept at -80°C until assayed.

## HDL composition

HDL composition is expressed as percent of esterified cholesterol (EC), free cholesterol (FC), phospholipids (PL), TG and total proteins as described in<sup>36</sup>. CT, CL and TG were quantified using enzymatic colorimetric commercial kits (Wako Pure Chemical Industries, Japan, and Randox TRIGS, United Kingdom). CE was estimated as  $(CT - CL) \times 1.67$ . The

Bradford technique (Bio-Rad reagent) was applied to determine the protein concentration<sup>37</sup>, whereas phospholipids were quantified with the Bartlett method<sup>38</sup>. The lipoprotein weight ratio, which gives an estimation of its size, was computed as the ratio of the components in the core of the particle to the components on its surface: (TG + EC) / (PL + FC + proteins)<sup>39</sup>.

### HDL delipidation

For the mass spectrometry analysis, lipid-extracted HDL fractions were employed since phospholipids are known to interfere with the ionisation process, reduce the signal and produce low-quality results<sup>40</sup>. To one volume of HDL, 5 volumes of a mix of ethanol: ethyl ether (3:1) were added, thoroughly vortexed and left at -20°C overnight. The supernatant was separated in a 25-min low-speed centrifugation at -20°C, then removed and replaced with 2 volumes of the initial mix. Following a second 4 hour-incubation at -20°C, the supernatant was isolated in the same conditions and removed completely. Protein pellets were dried under nitrogen, dissolved in saline of physiological density (1.006g/ml) and homogenised.

### Mass spectrometry analyses and protein quantification

The mass spectrometry analyses were carried out at the Institute for Research in Immunology and Cancer (Université de Montréal, Canada) on 25 µg of proteins from delipidated HDL. Sample reduction was performed by adding 50 µl of 5mM TCEP in 100 mM ammonium bicarbonate to the dry sample. Alkylation was performed by adding 50 µl

of chloroacetamide 20 mM with ammonium bicarbonate 100mM. Trypsin (1  $\mu$ g) was added and the digestion was performed for 8 h at 37°C. Samples were loaded and separated on a home-made C<sub>18</sub> analytical column (15cm \* 150  $\mu$ m i.d.) with a 116-min gradient from 0–30% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on a Easy nLC (Dionex) connected to a Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 60,000 resolution was followed by up to 20 MS/MS spectra, where the 20 most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Peptides were identified using Peaks 8.0 (Bioinformatics Solution Inc.) and peptide sequences were blasted against the Human Uniprot database. Tolerance was set at 10 ppm for precursor and 0.01 Da for fragment ions for protein identification and 7ppm and 2min for peptide alignment and profiling. FDR threshold was set to 0.01. For the post-translational modification of proteins, occurrence of carbamidomethylation (C), oxidation (M), deamidation (NQ) was considered. Volcano plots were made with Perseus 1.5.0.30.

## Statistical analyses

Results are presented as means  $\pm$  SEM. The distributions were systematically tested for normality before the appropriate tests were applied. The parametric (Student *t*-test, Student *t*-test for paired data, repeated one-way ANOVA with Newman-Keuls *post-hoc* analysis) and non-parametric tests (Mann Whitney's U test, Wilcoxon's, or Friedman's with Dunn's *post-hoc* analysis) were performed using Prism 5.01 (GraphPad Software, USA). A *p*-value of 0.05 was considered significant.

## RESULTS

### Study participants

The present study includes a total of 24 subjects (50 % males): 8 healthy subjects (Controls), 8 metabolically healthy ALL survivors (Healthy), and 8 metabolically unhealthy ALL survivors (Unhealthy). The participants were matched for age and gender. The anthropometrics data are presented in **Table 1**, the metabolic characterization is presented in **Table 2**, while the lipid profiles of the participants are presented in **Table 3**. The analyses on the therapies administered to the patients concern 14 participants due to missing values in 2 cases.

**Table 1. Anthropometric characteristics and treatment details of the participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>N (male)</b>	8 (4)	16 (8)	8 (4)	8 (4)
<b>Age (years)</b>	24.2 ± 2.0	24.3 ± 1.1	23.3 ± 1.6	25.4 ± 1.6
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.5 ± 0.8	25.3 ± 1.6	22.3 ± 1.0	28.2 ± 2.7
<b>Waist circumference (cm)</b>				
Men	87.0 ± 2.8	86.4 ± 4.9	79.1 ± 7.4	93.8 ± 4.6
Women	80.6 ± 2.7	88.1 ± 7.7	78.6 ± 2.9	97.5 ± 14.5
All	83.8 ± 2.2	87.2 ± 4.4	78.8 ± 3.7	95.6 ± 7.1 *
<b>Age at diagnosis (years)</b>	NA	8.5 ± 1.3	10.9 ± 1.8	6.2 ± 1.7
<b>Event-free remission (years)</b>	NA	13.6 ± 1.6	10.2 ± 1.1	17.1 ± 2.6
<b>Treatments</b>				
Chemotherapy only		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
Without cardioprotection	NA	1	1	0
With cardioprotection		1	1	0
Radiotherapy only	N			
	A	0	0	0
Chemotherapy + radiotherapy	N			
	A	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
Without cardioprotection	N	5	1	4
With cardioprotection	A	7	5	2
<b>Cranial radiotherapy dose (Gy)</b>				
0	NA	2	2	0

12	NA	6	4	2
18		6	2	4
<b>Protocol administered</b>				
DFCI 1987-01	N	1	0	1
DFCI 1991-01	A	2	0	2
DFCI 1995-01	N	3	2	1
DFCI 2000-01	A	5	4	1
DFCI 2005-01	N	3	2	1
<b>Active smoking</b>	0	3	1	2

Data on anthropometrics were collected on ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). All survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). NA, non-applicable.

Results are presented as Mean  $\pm$  SEM. BMI: body mass index, DFCII: Dana-Farber Cancer Institute, Gy: Gray; \*p<0.05 vs Healthy

**Table 2 : Metabolic characterization of the study participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>BP (mmHg)</b>				
Systolic	-	124 $\pm$ 4	117 $\pm$ 4	130 $\pm$ 7
Diastolic	-	72 $\pm$ 3	66 $\pm$ 3	77 $\pm$ 5
<b>FBG (mmol/L)</b>	5.1 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.1	4.8 $\pm$ 0.1	4.9 $\pm$ 0.2
<b>OGTT (mmol/L)</b>				
30 min	-	8.5 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.5	8.9 $\pm$ 0.6
60 min	-	7.8 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 0.9 *
120 min	-	5.9 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.3	6.4 $\pm$ 0.8
<b>MDA (pmol/ml)</b>	298 $\pm$ 49	685 $\pm$ 95 #	692 $\pm$ 172	678 $\pm$ 96
<b>CRP (mg/L)</b>	-	1.8 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.7 *
<b>Number of MetS criteria</b>				
0	8	8	8	0
1	0	1	0	1
2	0	6	0	6
3	0	0	0	0
4	0	1	0	1

Data on metabolic status were collected on ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Mets was defined per the NCEP ATP III (SOURCE), with the following cut-offs: i) waist circumference > 88cm for women and > 102cm for men, ii) HDL-C < 1.29 mmol/L for women and <1.03 mmol/L for men, iii) systolic blood pressure >130 or diastolic >85 mmHg, iv) fasting blood glucose > 6.1mmol/L. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM. BP: blood pressure, CRP: C-reactive protein, FBG: fasting blood glucose, MDA : malondialdehyde, MetS : metabolic syndrome, OGTT : oral glucose tolerance test; #p<0.05 vs Controls, \*p<0.05 vs Healthy.

**Table 3 : Lipid profiles of the study participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>TG</b> (mmol/L)	0.90 ± 0.08	1.30 ± 0.36	0.79 ± 0.10	1.82 ± 0.69
<b>TC</b> (mmol/L)	4.24 ± 0.15	4.46 ± 0.21	4.10 ± 0.22	4.82 ± 0.32
<b>LDL-C</b> (mmol/L)	2.27 ± 0.12	2.59 ± 0.16	2.22 ± 0.15	3.00 ± 0.20 ** ##
<b>HDL-C</b> (mmol/L)				
Men	1.41 ± 0.11	1.11 ± 0.09	1.29 ± 0.12	0.93 ± 0.03 *
Women	1.71 ± 0.08	1.42 ± 0.14	1.76 ± 0.11	1.07 ± 0.05 ** ##
All	1.56 ± 0.09	1.26 ± 0.09	1.53 ± 0.12	1.00 ± 0.04 ** ###
<b>Non-HDL-C</b> (mmol/L)	2.68 ± 0.15	3.20 ± 0.24	2.58 ± 0.14	3.82 ± 0.33 * ##
<b>Ratio TC/HDL-C</b>	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.3	2.8 ± 0.2	4.9 ± 0.4 *** ###

Lipid profiles were obtained from ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Results are presented as Mean ± SEM. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; \*p<0.05 vs Controls; \*\*p<0.01 vs Controls; \*\*\*P<0.001 vs Controls; ##p<0.01 vs Healthy; ###p<0.001 vs Healthy.

Although BMI was similar among the groups, the Unhealthy survivors displayed a significantly higher waist circumference than the Healthy survivors (**Table 1**). The Survivors did not differ in terms of age at diagnosis and time of event-free remission (**Table 1**). Most of the Survivors (85,7 %) received at least 12 Gy of radiotherapy. All the Unhealthy, but only 75% of the Healthy, were subjected to cranial radiotherapy. The Healthy were also better protected against cardiotoxicity: 75% of them received Dexrazoxane (which is a cardioprotective agent) versus 33% of the Unhealthy. Finally, at least one Unhealthy was treated under a version of every protocol (1987-01, 1991-01, 1995-01, 2000-01, 2005-01), while the Healthy received only the 3 latest versions. Three Survivors (18,8 %) reported to be active smokers (**Table 1**).

The Survivors did not statistically differ as to their blood pressure (**Table 2**). For glycaemia, the 3 groups have similar fasting glucose concentrations, but the levels of the

Unhealthy raised significantly more at 60 min following sugar intake. Importantly, the Survivors displayed higher levels of plasmatic MDA than the Controls (**Table 2**), and the Unhealthy disclosed a higher CRP level than the Healthy. Per our classification, all the Healthy and Controls displayed 0 component of the metabolic syndrome, whereas all the Unhealthy showed dyslipidemia (low HDL-C), and about 85 % had at least 2 components (**Table 2**).

All the Unhealthy presented with dyslipidemia (**Table 3**), some of them combining two abnormal lipid components such as low HDL-C (< 1.03 for men; <1.30 mmol/L for women) with high TG (>1.7 mmol/L), or high LDL-C (>3.4mmol/L). Compared to the Healthy and Control groups, the Unhealthy had higher levels of LDL-C and non-HDL-C, a higher ratio of TC/HDL-C, as well as lower levels of HDL-C. TC and TG levels were similar among the groups.

### HDL composition

The composition of the HDL, expressed as the percent of total components, is presented in **Table 4**. The HDLs from the Survivors showed a significantly lower content of FC compared to those of Controls, with the Unhealthy being even more depleted than the Healthy. EC was also diminished in the Unhealthy. On the other hand, the content in TG, PL, and proteins was similar in the 3 groups. The calculated weight ratio, which gives an indication of the size of the HDL, was higher in the Controls than in the Survivors, thereby indicating a slightly larger size for control HDLs.

**Table 4: HDL composition of ALL survivors and Controls**

% HDL	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
Triglycerides	1.95 ± 0.29	2.55 ± 0.89	1.33 ± 0.23	3.76 ± 1.72
Cholesterol				
Free	3.93 ± 0.21	3.33 ± 0.12 *	3.62 ± 0.09	3.04 ± 0.17 *** ##
Esterified	19.66 ± 1.12	17.51 ± 0.56	18.74 ± 0.64	16.28 ± 0.70 ** #
Phospholipids	29.83 ± 1.28	29.00 ± 0.96	29.12 ± 1.20	28.88 ± 1.59
Proteins	44.63 ± 1.55	47.62 ± 1.21	47.20 ± 1.40	48.05 ± 2.06
Weight ratio	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.01 *	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02

HDL of n=16 ALL survivors and n=8 gender- and age-matched healthy controls were characterized as described in Methods. ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Results, expressed as percent of the total components, are presented as Mean ± SEM. \*p <0.05 vs Controls; \*\*p <0.01 vs Controls; \*\*\*p <0.001 vs Controls; #p <0.05 vs Healthy; ##p <0.01 vs Healthy.

## HDL proteome analysis by LC-MS/MS

Although 204 proteins were identified by mass spectrometry (data not shown), only the proteins with at least 2 peptides found in a single sample measurement are presented in **Table 5**. Interestingly, only 31 proteins were commonly identified in all the 24 samples. Inversely, 26 proteins were single-hits, and 46 (34%) were only present in 3 samples or less.

**Table 5: Protein identification and distribution among the ALL and Control groups**

	Protein	Accession number	Number of exclusive unique peptides	% of sequence coverage	Group distribution				
					C	ALL survivors			Total
						All	H	U	
1	Alpha-1-antitrypsin	P01009	448	48.2 ± 6.7	8	16	8	8	24
2	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	192	26.0 ± 4.9	8	16	8	8	24
3	Apolipoprotein A-I	P02647	3633	91.7 ± 1.2	8	16	8	8	24
4	Apolipoprotein A-II	P02652	1074	77.2 ± 3.9	8	16	8	8	24
5	Apolipoprotein A-IV	P06727	1030	75.8 ± 8.1	8	16	8	8	24
6	Apolipoprotein B	P04114	2635	27.8 ± 11.8	8	16	8	8	24
7	Apolipoprotein C-I	P02654	540	61.6 ± 7.1	8	16	8	8	24
8	Apolipoprotein C-II	P02655	257	76.2 ± 8.9	8	16	8	8	24

9	Apolipoprotein C-III	P02656	381	76.6 ± 2.5	8	16	8	8	24
10	Apolipoprotein C-IV	P55056	87	24.5 ± 7.5	8	16	8	8	24
11	Apolipoprotein D	P05090	337	43.6 ± 5.6	8	16	8	8	24
12	Apolipoprotein E	P02649	895	81.9 ± 5.8	8	16	8	8	24
13	Apolipoprotein F	Q13790	130	18.7 ± 3.8	8	16	8	8	24
14	Apolipoprotein J	P10909	409	36.1 ± 3.8	8	16	8	8	24
15	Apolipoprotein L1	O14791	446	39.0 ± 6.1	8	16	8	8	24
16	Apolipoprotein M	O95445	428	62.7 ± 10.4	8	16	8	8	24
17	Complement C3	P01024	284	9.7 ± 3.3	8	16	8	8	24
18	Fibrinogen alpha chain	P02671	601	38.7 ± 8.8	8	16	8	8	24
19	Fibrinogen beta chain	P02675	232	17.0 ± 5.6	8	16	8	8	24
20	Haptoglobin-related protein	P00739	281	36.0 ± 13.1	8	16	8	8	24
21	Hemoglobin subunit beta	P68871	225	67.7 ± 11.7	8	16	8	8	24
22	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase (LCAT)	P04180	188	24.1 ± 4.0	8	16	8	8	24
23	Serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1)	P27169	470	65.2 ± 9.6	8	16	8	8	24
24	Serum paraoxonase/lactonase 3 (PON3)	Q15166	165	33.6 ± 8.7	8	16	8	8	24
25	Retinol-binding protein 4	P02753	131	33.2 ± 17.4	8	16	8	8	24
26	Serum amyloid A1	PODJI8	202	66.3 ± 13.0	8	16	8	8	24
27	Serum amyloid A2	PODJI9	59	47.1 ± 15.8	8	16	8	8	24
28	Serum amyloid A4	P35542	334	62.3 ± 6.7	8	16	8	8	24
29	Serum albumin	P02768	1623	82.8 ± 5.0	8	16	8	8	24
30	Vitamin D-binding protein	P02774	205	24.0 ± 9.1	8	16	8	8	24
31	Vitronectin	P04004	138	15.2 ± 4.0	8	16	8	8	24
32	Cholesteryl ester transfer protein (CETP)	P11597	78	9.5 ± 2.8	8	15	8	7	23
33	Complement C4-B	P0C0L5	200	7.5 ± 3.7	7	16	8	8	23
34	Platelet basic protein	P02775	129	41.9 ± 7.9	7	16	8	8	23
35	Phospholipid transfer protein (PLTP)	P55058	167	18.0 ± 7.3	8	15	8	7	23
36	Actin, cytoplasmic 1	P60709	217	39.5 ± 11.2	8	14	7	7	22
37	Anthrax toxin receptor 2	P58335	59	7.4 ± 3.6	8	14	7	7	22
38	Preylcystein oxidase 1	Q9UHG3	185	22.1 ± 6.7	7	15	7	8	22
39	Transferrin	P02766	146	62.0 ± 9.4	7	15	7	8	22
40	Hemoglobin subunit alpha	P69905	109	44.1 ± 14.9	5	15	8	7	20
41	Platelet factor 4	P02776	78	39.2 ± 12.5	6	14	7	7	20
42	Protein MENT	Q9BUN1	49	9.1 ± 1.5	6	14	8	6	20
43	Apolipoprotein H	P02749	80	15.9 ± 7.4	6	13	6	7	19
44	Apolipoprotein (a)	P08519	431	6.7 ± 3.8	6	12	6	6	18
45	Beta-Ala-His dipeptidase	Q96KN2	70	12.9 ± 5.2	6	12	6	6	18
46	Keratinocyte differentiation-associated protein	P60985	31	27.4 ± 17.1	7	11	5	6	18
47	Proactivator polypeptide	P07602	28	4.5 ± 1.0	5	13	7	6	18
48	Haptoglobin	P00738	26	19.3 ± 7.7	4	13	7	6	17
49	Ig alpha-1 chain C region	P01876	58	15.3 ± 4.7	6	11	4	7	17
50	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	183	18.5 ± 11.3	7	10	4	6	17
51	Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	162	21.7 ± 9.6	5	11	4	7	16
52	Apolipoprotein A-V	Q6Q788	51	17.6 ± 7.2	4	11	7	4	15

53	Fibrinogen gamma chain	P02679	44	11.3 ± 3.5	3	12	6	6	15
54	Protein AMBP	P02760	33	8.8 ± 2.6	4	11	6	5	15
55	Actin, alpha cardiac muscle 1	P68032	18	23.1 ± 4.8	3	11	5	6	14
56	Band 3 anion transport protein	P02730	41	7.1 ± 3.2	2	10	4	6	12
57	Filamin-A	P21333	58	3.7 ± 2.0	2	10	5	5	12
58	Gelsolin	P06396	27	6.1 ± 2.1	3	8	2	6	11
59	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Q8NBP7	17	3.2 ± 0.5	5	6	4	2	11
60	Carbonic anhydrase 6	P23280	25	11.9 ± 2.8	4	5	2	3	9
61	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q14624	56	8.8 ± 2.3	4	5	3	2	9
62	Talin-1	Q9Y490	44	3.3 ± 2.1	3	6	3	3	9
63	UPF0669 protein C6orf120	Q7Z4R8	13	18.0 ± 7.8	4	5	2	3	9
64	Complement component C9	P02748	20	4.8 ± 1.2	2	6	4	2	8
65	Serotransferrin	P02787	66	13.8 ± 10.6	1	7	4	3	8
66	Tissue factor pathway inhibitor	P10646	14	13.4 ± 4.5	0	8	2	6	8
67	Angiotensinogen	P01019	17	6.7 ± 1.2	1	6	3	3	7
68	Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913	24	20.0 ± 3.1	3	4	2	2	7
69	Homeobox protein Nkx-2.4	Q9H2Z4	18	2.8 ± 0.0	3	4	1	3	7
70	Multimerin-2	Q9H8L6	13	3.8 ± 0.4	0	7	4	3	7
71	Plasma protease C1 inhibitor	P05155	10	4.1 ± 1.0	2	5	3	2	7
72	Fibronectin	P02751	9	1.6 ± 0.7	0	6	3	3	6
73	Keratin type 1, cytoskeletal 10	P13645	16	14.7 ± 9.9	3	3	1	2	6
74	Alpha-2-antiplasmin	P08697	13	7.4 ± 1.8	3	2	1	1	5
75	Beta-2-microglobulin	P61769	13	23.3 ± 12.6	1	4	1	3	5
76	Complement factor D	P00746	10	16.0 ± 1.6	1	4	2	2	5
77	Fibroblast growth factor-binding protein 2	Q9BYJ0	10	14.6 ± 5.4	1	4	2	2	5
78	Integrin alpha-IIb	P08514	21	7.2 ± 3.1	1	4	2	2	5
79	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	14	19.5 ± 5.0	0	4	2	2	4
80	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	P05534	33	33.5 ± 8.3	1	3	1	2	4
81	Ig kappa chain C region	P01834	7	26.3 ± 5.8	1	3	2	1	4
82	Integrin beta-1	P05556	7	3.8 ± 0.8	0	4	4	0	4
83	Integrin beta-3	P05106	15	6.7 ± 2.0	0	4	2	2	4
84	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	18	14.1 ± 8.5	2	2	1	1	4
85	Kininogen-1	P01042	11	4.5 ± 1.0	3	1	0	1	4
86	Profilin-1	P07737	10	21.8 ± 8.8	2	2	2	0	4
87	Pulmonary surfactant-associated protein B	P07988	15	22.5 ± 10.5	1	3	2	1	4
88	SPARC-like protein 1	Q14515	8	5.9 ± 1.3	0	4	3	1	4
89	Hemoglobin subunit delta	P02042	6	57.0 ± 10.7	0	3	1	2	3
90	Hemopexin	P02790	6	10.2 ± 0.5	1	2	1	1	3

91	Indian hedgehog protein	Q14623	8	14.3 ± 3.6	0	3	1	2	3
92	Myosin-9	P35579	22	5.8 ± 5.5	0	3	1	2	3
93	Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)	Q13093	7	6.8 ± 1.8	2	1	1	0	3
94	Protein Z-dependent protease inhibitor	Q9UK55	5	8.5 ± 3.3	1	2	2	0	3
95	Ras-related protein Rap-1b	P61224	6	12.0 ± 1.3	0	3	3	0	3
96	Thrombospondin-1	P07996	12	4.9 ± 2.1	0	3	2	1	3
97	CD99 antigen	P14209	4	23.0 ± 17.1	0	2	0	2	2
98	Cystatin-C	P01034	6	29.0 ± 4.0	1	1	0	1	2
99	Dermeidin	P81605	3	25.0 ± 6.0	0	2	0	2	2
100	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	7	18.0 ± 6.0	0	2	2	0	2
101	Ig gamma-1 chain C region	P01857	3	7.4 ± 2.6	0	2	2	0	2
102	Keratin, type 1 cytoskeletal 14	P02533	3	7.7 ± 1.6	2	0	0	0	2
103	L-selectin	P14151	7	8.8 ± 0.0	1	1	1	0	2
104	Pigment epithelium-derived factor	P36955	7	8.6 ± 5.5	0	2	1	1	2
105	Plasminogen	P00747	5	5.9 ± 0.6	1	1	0	1	2
106	Platelet glycoprotein Ib beta chain	P13224	4	5.4 ± 0.0	1	1	1	0	2
107	Trypsin-3	P35030	4	11.5 ± 1.5	1	1	1	0	2
108	Tubulin alpha-4A chain	P68366	7	12.0 ± 6.0	0	2	2	0	2
109	Alpha-2-macroglobulin	P01023	5	6.5	1	0	0	0	1
110	Alpha-actinin-1	P12814	6	9.2	0	1	1	0	1
111	Angiopoietin-related protein 3	Q9Y5C1	2	8.0	1	0	0	0	1
112	Ankyrin-1	P16157	2	2.7	0	1	0	1	1
113	Anthrax toxin receptor 1	Q9H6X2	2	5.7	1	0	0	0	1
114	C4b-binding protein alpha chain	P04003	5	14.0	0	1	0	1	1
115	Coagulation factor XIII A chain	P00488	3	5.6	0	1	1	0	1
116	Cofilin-1	P23528	2	27.0	0	1	1	0	1
117	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	2	13.0	0	1	1	0	1
118	Glycogen phosphorylase, muscle form	P11217	5	11.0	0	1	0	1	1
119	GTP-binding protein SAR1a	Q9NR31	2	27.0	0	1	1	0	1
120	Integrin-linked protein kinase	Q13418	3	11.0	0	1	1	0	1
121	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750	3	17.0	0	1	1	0	1
122	Multimerin-1	Q13201	2	2.5	0	1	1	0	1
123	Myosin light polypeptide 6	P60660	2	15.0	0	1	1	0	1
124	Peroxyredoxin-6	P30041	2	15.0	0	1	1	0	1
125	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	P80108	2	3.8	0	1	1	0	1
126	Pleckstrin	P08567	3	19.0	0	1	1	0	1

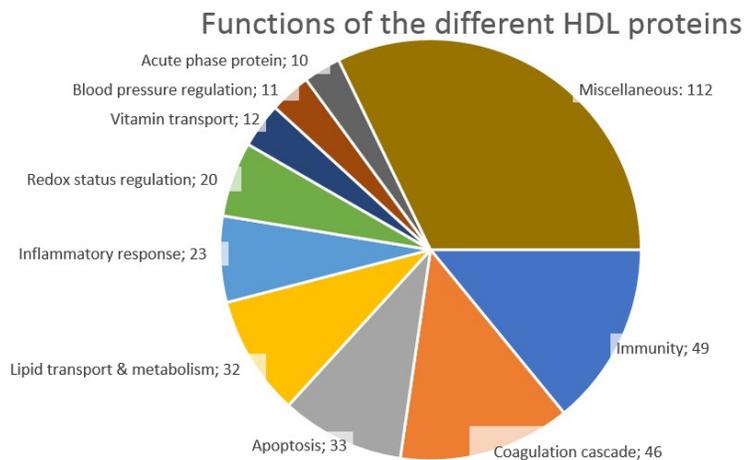
127	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	2	6.2	0	1	1	0	1
128	RUN domain-containing protein 3A	Q59EK9	2	1.7	0	1	0	1	1
129	Sonic hedgehog protein	Q15465	2	6.7	1	0	0	0	1
130	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	2	4.3	0	1	1	0	1
131	Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	2	14.0	0	1	1	0	1
132	Trypsin-2	P07478	2	17.0	1	0	0	0	1
133	Tubulin beta-1 chain	Q9H4B7	3	12.0	0	1	1	0	1
134	Tubulin beta-2A chain	Q13885	2	11.0	0	1	1	0	1

Proteins from delipidated HDLs were identified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Identification thresholds were: FDR <1%, minimum 2 peptides in a single sample. Results are presented as Mean  $\pm$  SEM. Controls (C, n=8), Healthy (H, n=8), Unhealthy (U, n=8)

## Functions of the proteins

We classified the identified proteins according to their known HDL function, when the information was available. **Figure 1** presents a compilation of the different roles of the proteins detected in our study, as sorted out by the Gene Ontology terms from the UniProt KnowledgeBase. We regrouped the terms in categories relating to «lipid transport and metabolism», «redox status regulation», «coagulation cascade», «immunity», «apoptosis regulation», «inflammatory response regulation», «vitamin transport», «blood pressure regulation» and the «acute phase proteins». Since some proteins are involved in additional biological pathways, we consequently created the category «miscellaneous». Because we considered all the functions for every protein, the total exceeds n= 134 proteins. Indeed, 112 proteins have at least one action of little interest, with 30 of these proteins having no interest for us at all. Two apolipoproteins, Apo A-I and Apo E, were the most polyvalent, fulfilling 9 roles each (all except «acute phase protein»). Apo J and Apo A-II fulfilled 7 roles, while Apo D, angiotensinogen and thrombospondin-1 were players in 6 categories. However, most of the proteins (57,5%) could be classified only in 1-2 categories.

Surprisingly, the category «lipid transport and metabolism» came in the fifth place (23.9%), behind «miscellaneous» (83,5%), «immunity» (36.6%), «coagulation cascade» (34.3%), and «apoptosis» (24.6%) (**Figure 1**). Of the 31 proteins found in every single sample, the distribution was different: «miscellaneous» still led with 64.5 % of the proteins, but «lipid transport and metabolism» came in second with 54.8%, followed by «immunity», «inflammatory response», and «coagulation cascade» at 45,3 %, 32,3%, and 32,3%, respectively.



**Figure 1: Roles of the different proteins found in the HDL.**

The HDL function enabled by the detected proteins were defined from the Gene Ontology terms from the UniProt Knowledgebase (n=10 categories, n=134 proteins). All the roles that applied for a single protein were considered. Results define the role and the number of proteins involved in this function.

### Proteins present only in the ALL Survivors

Thirty-nine proteins were found in at least one survivor but were totally absent of the Control group (**Table 5**). While 15 of these proteins do not have any known function that relates to the HDL, 7 proteins could be beneficial to the HDL function, 15 are detrimental, and 2 proteins might be both beneficial and detrimental. The beneficial proteins are mostly

anti-apoptotic or pro-immunity, with pigment epithelium-derived factor also being anti-inflammatory, peroxiredoxin-6 is antioxidant and promotes lipid catabolism, and tissue factor pathway inhibitor is anti-thrombotic. 14-3-3 protein zeta/delta and integrin-linked protein kinase are both pro-thrombotic and anti-apoptotic. Finally, 13 proteins promote thrombosis, 4 are pro-apoptotic, and 2 interfere with the transport and metabolism of lipids. The worst proteins are integrin beta-3 (pro-thrombotic, negatively regulates lipid transport, and reduces the biosynthesis of LDL-receptor), thrombospondin-1 (pro-apoptotic, pro-inflammatory, pro-oxidant, anti-immunity and pro-thrombotic), and phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D (pro-apoptotic, negatively regulates TG catabolism and promotes HDL particle clearance). Apparently, the anti-thrombotic capacity of the HDL would be compromised in ALL survivors.

### Proteins missing in all the Survivors samples

On the other hand, only 6 proteins were exclusive to the Control group: alpha-2-macroglobulin, angiopoietin-related protein 3, anthrax toxin receptor 1, sonic hedgehog protein, trypsin-2, and keratin type 1 cytoskeletal 14 (**Table 5**). These proteins have no impact on the regulation of the redox status / blood pressure / inflammation, nor the acute phase response or vitamin transport. Angiopoietin-related protein 3 is considered beneficial as it promotes lipid metabolism and raises HDL-C levels. Sonic hedgehog protein is ambivalent, being anti-apoptotic while negatively regulating the cholesterol efflux. Alpha-2-macroglobulin is detrimental as it is anti-immunity and pro-thrombotic. The last 3 proteins have no known link with the HDL function.

## Proteins absent in the HDLs from Unhealthy survivors

We found 6 proteins present in the HDLs of both the Controls and Healthy, but absent in Unhealthy samples: L-selectin, platelet glycoprotein Ib beta chain, trypsin-3, platelet-activating factor acetylhydrolase, protein Z-dependent protease inhibitor, and profilin-1 (**Table 5**). The beneficial proteins L-selectin and protein Z-dependent protease inhibitor respectively promote immunity and have an anti-thrombotic activity. Platelet-activating factor acetylhydrolase is mostly beneficial (being anti-thrombotic and promoting lipid metabolism) even if it can promote the oxidation of lipoproteins. Platelet glycoprotein Ib beta chain is pro-thrombotic, while trypsin-3 and profilin-1 have no effect on the HDL's functions of interest.

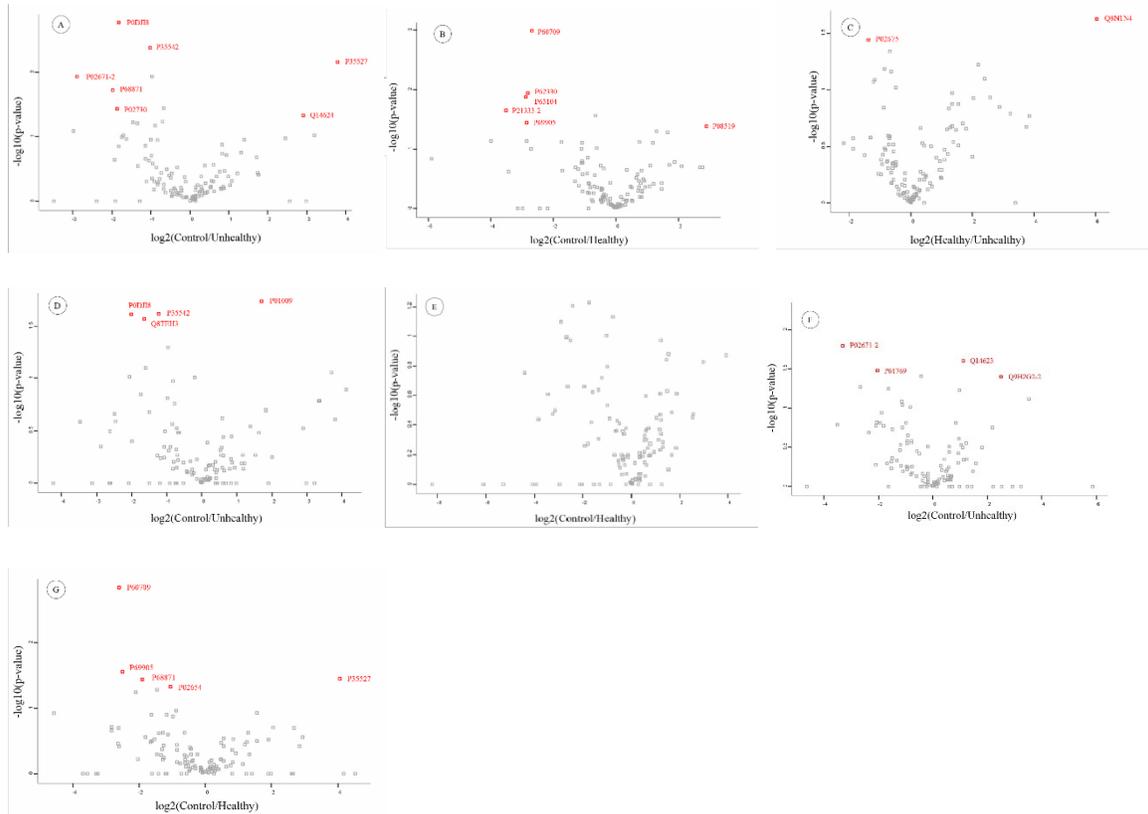
## Proteins present only in the Unhealthy samples

Finally, the Unhealthy samples displayed 6 proteins that were not found in the participants with 0 metabolic disorder: Ankyrin-1, C4b-binding protein alpha chain, CD99 antigen, dermcidin, glycogen phosphorylase muscle form, and RUN domain-containing protein 3A (**Table 5**). The only 2 proteins with known functions related to the HDL are C4b-binding protein alpha chain and dermcidin, even if dermcidin is mostly contained in the sweat. C4b-binding protein is a potent inhibitor of the complement activation, thus limiting the action of the immune system.

## Protein quantification

To gain insight into the differential HDL proteins detected in the 3 groups, we quantified peptide abundances by measuring precursor peak areas, which is a label-free technique. It is established that the area under the curve of a peptide correlates quite well with the quantity of the protein in the sample. In **Figure 2**, the results are presented in the form of Volcano plots, which indicate both the magnitude of the change ( $\log_2$  fold change), x-axis) and the statistical significance ( $-\log_{10}$  ( $p$ -value), y-axis) defined as the reproducibility of the observation. We considered that a modification in the expression of a protein would have a potential clinical significance provided it was at least halved or doubled compared to the controls, which corresponds to the values inferior to «-1» or superior to «1» on the x-axis. On the y axis, a value  $> 1,3$  equals a  $p$ -value  $< 0,05$ . We identified the proteins that corresponded to both these criteria in the different analyses.

When we included the two genders in the analysis, the Unhealthy survivors have more *fibrinogen alpha chain*, *hemoglobin beta chain*, *SAA1*, *SAA4* and *band 3 anion transport protein* on their HDLs than their matched Controls (**Figure 2A**). On the other hand, the Controls display more *keratin (K1C9)* and *inter-alpha-trypsin inhibitor 4* than the Unhealthy (**Figure 2B**). The Healthy survivors have more *actin (cytoplasmic 1)*, *ADP-ribosylation factor 6*, *14-3-3 protein zeta/delta*, *filamin-A* and *hemoglobin alpha chain* than their Controls, while the Controls have surprisingly more *Apo (a)* on their HDLs. Finally, the Healthy survivors present less *fibrinogen beta chain* and more *keratin (type 2 cytoskeletal 78)* than the Unhealthy survivors (**Figure 2C**).



**Figure 2: Volcano plot representations of the proteins statistically differently expressed between 2 groups. (A) Controls vs Healthy, (B) Controls vs Unhealthy, (C) Healthy vs Unhealthy, (D) Controls vs Unhealthy (women only), (E) Controls vs Healthy (women only), (F) Controls vs Unhealthy (men only), (G) Controls vs Healthy (men only).** X-axis represents the variation in expression [ $\log_2(\text{fold change})$ ], y-axis represents the statistical significance [ $-\log(\text{p-value})$ ]. Proteins with coordinates (x,y) where x is  $<-1$  or  $>1$  and y is  $> 1,3$  are statistically reproducibly halved or doubled in a group of samples.

When we refined the analysis to focus only on the samples from female subjects, it appears that the Unhealthy survivors are depleted in *alpha-1-antitrypsin* and enriched in *SAA1* and *SAA4* versus the Controls (**Figure 2D**), while there is no difference between the Controls and the Healthy survivors (**Figure 2E**). Similarly, the male Unhealthy survivors are depleted in *indian hedgehog protein* and enriched in *fibrinogen alpha chain* and *beta-2-*

*microglobulin* versus the Controls (**Figure 2F**). These Controls have less *hemoglobin alpha* and *beta*, as well as less *apo C-I* than the Healthy survivors (**Figure 2G**).

Proteins with a differential expression among the groups

Besides displaying 13 pro-thrombotic proteins that are totally absent from HDLs of Controls, the HDLs of Unhealthy survivors also overexpressed 4 pro-thrombotic proteins, as well as 2 pro-inflammatory proteins (**Figure 2A, 2D, 2F**). When we refined the analyses by gender, we observed a similar tendency: the HDLs of female Unhealthy survivors were enriched in the pro-inflammatory proteins SAA1 and SAA4 versus the Controls. Similarly, the HDLs of male Unhealthy survivors were enriched in fibrinogen alpha chain (pro-thrombotic, pro-hypertensive and anti-apoptotic) versus Controls. These controls have less hemoglobin (alpha and beta, pro-apoptotic but antioxidant) and apo C-I (anti-lipid metabolism) than the Healthy survivors.

## DISCUSSION

Our study on the HDLs of young ALL survivors indicates an altered metabolism and a shift in their proteome affecting specifically their anti-thrombotic, anti-apoptotic and anti-inflammatory capacities. These HDLs have an abnormal composition with a lower content of free and esterified cholesterol compared to controls. They also expressed some proteins not detectable in the control samples; most of them are either pro-thrombotic or pro-apoptotic. Finally, HDLs from unhealthy survivors expressed at least twice more of the pro-thrombotic and pro-inflammatory proteins SAA and fibrinogen compared to controls. The pro-atherogenic profile of the survivors was often worsened by dyslipidemia parameters such as high TG or high LDL-C. Although a few reports are available on HDLs

in the context of inflammatory or auto-immune diseases, we are the first group to our knowledge to investigate HDL proteomics of cancer survivors, especially in the pediatric population.

HDLs are key players in the management of the body homeostasis and they help maintaining cardiometabolic health. Their anti-atherosclerosis action, through the promotion of cholesterol efflux and reverse transport to the liver leading to its final elimination (via bile acid conversion), is their most well-known and studied function<sup>11,41</sup>. However, HDLs have a pleiotropy of additional actions. Indeed, they display anti-inflammatory, anti-hypertensive, anti-apoptotic, antioxidative and anti-thrombotic actions, while also participating in the immune response<sup>12,14,16,27,28,42-44</sup>. The HDL multifunction is made possible by its high content of bioactive lipids and especially its numerous protein moieties. Undoubtedly, the appropriate composition of these components is primordial to the normal function of HDL since their imbalance is detrimental to cardiometabolic and cardiovascular health<sup>45,46</sup>.

Apparently, most subjects present low HDL-C levels when they receive a diagnosis of cancer<sup>47-50</sup>, which indicates a change in HDL metabolism due possibly to their proteomic content. Although the treatment and remission of cancer patients are usually associated with a rise in HDL-C levels<sup>49</sup>, a substantial proportion of survivors still exhibit low HDL-C levels even during the remission<sup>48</sup>. In addition to low HDL-C concentrations<sup>36,47</sup>, ALL survivors often present cardiometabolic derangements such as obesity, hypertension and dyslipidemia<sup>36</sup>. Previously, we demonstrated that altered lipoprotein composition characterized dyslipidemic ALL survivors<sup>36</sup>. Therefore, it is plausible that their HDLs may undergo inappropriate metabolism because of abnormal protein composition, thereby

affecting their level of functionality. Surprisingly, this important aspect has never been studied. Since the functions of HDLs are strongly dependent on their protein content, we applied mass spectrometry techniques to investigate the proteome of HDLs isolated from childhood ALL survivors. Interest for proteomics is increasing and this straightforward approach is rapidly becoming a valuable tool for the confident identification of differentially expressed proteins. Applying the robust proteomics technology with high throughput capabilities would not only extend our knowledge and understanding of HDL metabolism in ALL, but it may also provide new potential diagnostic, prognostic or therapeutic biomarkers for the patients.

## General composition of HDL

We report first that the HDLs from the unhealthy survivors of childhood ALL are depleted in free and esterified cholesterol, with no change in their other relative protein and lipid moieties. This depletion in cholesterol is not unexpected in the context of dyslipidemia characterizing ALL survivors as it has been reported in cardiometabolic disorders such as the metabolic syndrome<sup>51</sup>, obesity<sup>52</sup> and diabetes<sup>53</sup>, or in complex pathologies including systemic lupus erythematosus<sup>54</sup> and end-stage renal disease<sup>45</sup>. The type of cholesterol affected (free or esterified) differs between the studies. We are one of the few groups to report lowering of the two cholesterol forms<sup>52,55</sup>. A shift towards smaller HDLs is also observed by most of these groups<sup>45,51,52,54,55</sup>. However, they also report an enrichment of TG in the HDL, which we did not observe. Hence, cancer survivors seem to have a distinct pattern of HDL alterations, comprised of a diminution in the content of both forms of

cholesterol (FC and EC), but no enrichment of TG. Our results are consistent with the shift towards smaller HDLs in pathological conditions, as demonstrated by a lower weight ratio in ALL Survivors<sup>36</sup>. The causes for low cholesterol in HDL of ALL survivors could be multiple. For example, limited LCAT activity<sup>45,56</sup>, poor cholesterol efflux from cells<sup>52,56</sup> and abnormally high CETP activity<sup>57</sup> have already been identified as causes of decreased HDL cholesterol content, which can render HDL inefficient in protecting against atherosclerotic plaque initiation and cardiovascular diseases development. Given the multitude of mechanisms that can reduce the ability to promote cholesterol efflux and affect the functionality of HDL, it is essential to turn to the proteomic approach that has a unique and significant advantages to profile the whole spectrum of proteins at once, which will subsequently speed up HDL functional research.

## Proteomic profiling by mass spectrometry

In a first step, we compared the high-resolution lipoproteomics of HDL from healthy controls to available findings in the literature in order to situate the robustness of our innovative approach. To this end, we selected 8 recent studies pertaining to HDL biology, which isolated HDLs by ultracentrifugation, adequately described their population, included a control arm, provided extensive data, separated the data of the controls and pathological subjects, and identified a significant amount of proteins<sup>24,26,27,58-62</sup>. The number of proteins identified in each study ranged from 49 to 190, while our own investigation revealed a total of 134 proteins in HDL. A total of 326 different proteins were reported in at least one of these studies or in our own, of which 171 (52,4%) were detected

only once. We were able to highlight 7 new proteins in the HDL, namely actin alpha cardiac muscle 1, band 3 anion transport protein, homeobox protein Nkx-2.4, keratinocyte differentiation-associated protein, trypsin-2, trypsin-3 and UPF0669 protein C6orf120. Only 18 proteins were found in all the studies: 11 apolipoproteins (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E, J, L1, and M) along with complement C3, haptoglobin-related protein, phosphatidylcholine-sterol acyltransferase, serum paraoxonase/ arylesterase 1, phospholipid transfer protein, serum amyloid A1/2, and vitronectin. Most of the HDL proteins (15/18) are related to lipid transport and metabolism. The only protein absent in our study but present in the other 8 investigations is alpha-1-acid glycoprotein 2. This protein is involved in the regulation of the immune system, the acute-phase response and the transport of diverse non-lipid molecules. Finally, of all the 115 proteins identified in at least 3 studies, 81 (70,4%) were detected in our work. The variations observed may be inherent to the different techniques and operators, the populations studied, and computational analyses.

## Imbalance of the anti-/pro-thrombotic equilibrium in HDL from survivors

In healthy individuals, HDLs are recognised to be anti-thrombotic, because they prevent platelet aggregation, regulate coagulation cascade, prolong the time of thrombus formation, and promote fibrin clot degradation. HDLs prevent platelet activation by inducing 2 of their potent inhibitors, e.g. prostacyclin PGI<sub>2</sub> and NO (via upregulation of eNOS activity)<sup>63</sup>. HDLs also transport the protein *platelet activating factor-acetylhydrolase* (PAF-AH) which hydrolyses platelet activating factor. As to the fibrin clots, HDLs act both on their

formation and degradation via reduction of thrombin formation and stimulation of plasmin generation<sup>64-66</sup>. Thrombin, the active form of prothrombin, is responsible for the cleavage of fibrinogen into fibrin, an insoluble fibre and the major clot component. Plasmin, the active form of plasminogen, is a key factor in fibrinolysis. In hypercoagulability states, anticoagulant functions are lowered, while the fibrinolysis is slowed down. In our study, of all the proteins that we identified, 46 (34%) were a part of the coagulation cascade, making it the third most frequent function, even surpassing lipid transport and metabolism. Thirteen HDL proteins expressed only by ALL Survivors were pro-thrombotic although half of the individuals exhibited the anti-thrombotic protein *tissue factor pathway inhibitor*. The wide variety of pro-thrombotic proteins found in these samples probably outweighs *tissue factor pathway inhibitor*'s effect. One of these pro-thrombotic proteins is thrombospondin-1, which is also pro-apoptotic and pro-inflammatory. It has been reported in HDLs from ACS patients, but not in stable CAD or healthy controls<sup>58</sup>. HDLs from patients with chronic heart failure were also not enriched in this protein<sup>62</sup>. It might be that the pro-thrombotic phenotype is associated with a more acute condition.

The analyses on the differential expression of the proteins can identify those that are reproducibly under- or overexpressed. In particular, the HDLs from the survivors displayed overexpression of many pro-thrombotic proteins, which could be consistent with the higher rate of thromboembolism in this population<sup>4,67</sup>. The HDLs from unhealthy survivors showed an overexpression of *fibrinogen alpha chain* (compared to healthy controls), and *fibrinogen beta chain* (compared to healthy survivors). Fibrinogen levels have been examined in cancer, but only in the serum, and usually at the diagnosis<sup>68,69</sup>. Even if a few groups investigated the effect of chemotherapy on its levels, no data was reported during

treatment (>1 month). Normal plasma concentrations of fibrinogen have been found at diagnosis of childhood ALL<sup>68-70</sup>, but asparaginase administration made them drop by up to 75%<sup>68-70</sup>. Only one study reassessed the levels of serum fibrinogen and found that a 2-week asparaginase withdrawal was enough to normalize fibrinogen levels<sup>70</sup>. Another chemotherapy agent, methotrexate, did not impact fibrinogen levels in childhood ALL<sup>71</sup>. For now, the mechanisms for fibrinogen enrichment in HDLs from childhood ALL survivors are not clear. Since higher serum fibrinogen have been reported in populations of cancer survivors<sup>48,72</sup>, it is possible that this causes a significant binding to HDL. Importantly, previous HDL profiling in different disorders evidenced wide divergences as some studies showed no fibrinogen at all<sup>60</sup>, some same fibrinogen quantities in samples from patients and healthy individuals<sup>26,27,62</sup>, a lower content of fibrinogen (alpha and beta chains) in some diseases<sup>59</sup>, and finally non-statistically<sup>24,58</sup> or statistically<sup>28</sup> significant enrichment. Since the HDL proteome has never been studied in cancer patients, we do not know whether this is exclusive to LLA survivors, only to pediatric cancer survivors, or common among all the cancer survivors.

The antithrombotic activity of HDL has very rarely been assessed. There are a few techniques available, but they are meant to test whole blood samples instead of isolated lipoproteins. Additionally, in the present study, limited HDL sampling did not allow us to validate the proteomics results by assessment of fibrinogen activity. Interestingly, we found that the HDLs of our Survivors are smaller than those of Controls, a situation that could predispose to thrombosis, as it was the case for CAD patients<sup>73</sup>.

## Imbalance of the anti-/pro-inflammatory equilibrium in HDL from survivors

In healthy individuals, HDLs are recognised to be anti-inflammatory, because they reduce the expression of several cell surface adhesion proteins, (intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and E-selectin), and chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)) by the endothelial cells<sup>16,60</sup>. These proteins are responsible for the recruitment and transmigration of macrophages in the intima, where they will absorb oxidized LDLs, transform into foam cells and begin the process of atherosclerosis. Apo A-I and the different phospholipids mediate most of this action<sup>17,74</sup>.

Systemic inflammation is seen in serious cardiovascular conditions, and associated with greater quantities of serum amyloid A (SAA), which can rise to a thousand times the normal levels<sup>75</sup>. SAA is a potent pro-inflammatory protein, able to stimulate the expression of ICAM/VCAM-1 and MCP-1<sup>16,75,76</sup>. HDLs in inflammation are often enriched in SAA, as seen in ACS<sup>77</sup>, STEMI<sup>78</sup>, CAD<sup>77</sup>, ESRD<sup>16,79</sup> and psoriasis<sup>46</sup> patients. SAA enrichment of HDL renders it dysfunctional, especially pro-inflammatory<sup>16,60,77</sup>, but also inefficient to promote cholesterol efflux<sup>79</sup> and NO production<sup>27</sup>, in part because SAA is known to displace Apo A-I from the HDLs<sup>46,75</sup>. Although radiotherapy can cause a temporary rise of SAA and CRP in the blood circulation<sup>80</sup>, the effects of cancer and its treatments on SAA are unclear. It seems that SAA can rise in active untreated cancers, and reaches the highest levels in metastatic or advanced malignancies<sup>81</sup>. However, it has not been studied whether chemotherapy or other treatments allow normalization of plasma SAA levels.

In our study, ALL survivors had a more inflammatory profile, as demonstrated by the higher serum levels of CRP ( $2,5 \pm 0,7$  vs  $1,1 \pm 0,5$  mg/ml (healthy subjects),  $p= 0,0269$ ) and MDA ( $678 \pm 96$  vs  $298 \pm 49$  pmol/ml,  $p=0,0115$ ) compared to the controls. In line with published data, the HDLs from ALL survivors were also significantly enriched in SAA compared to the healthy controls. However, Apo A-I content was not altered in these samples. This combination of observations suggests that HDLs from survivors of pediatric cancers are less anti-inflammatory, if not downright pro-inflammatory. More studies are needed to investigate the functionality of SAA-enriched HDLs from cancer survivors.

This study has some limitations. First, we do not have any information on the post-translational modifications on the proteins, which could strongly affect the functionality of the lipoproteins. The specific lipid composition, especially the bioactive phospholipids species, was also not investigated.

## CONCLUSION

In conclusion, the results of this study indicate an alteration in the composition and proteome of HDLs isolated from survivors of pediatric acute lymphoblastic leukemia, favoring a pro-thrombotic and pro-inflammatory profile. Although more work is needed to validate the functionality of these HDLs, this may be relevant to the field of cancer survivorship in providing potential diagnostic, prognostic or therapeutic biomarkers of HDL functionality and metabolism in ALL.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by a grant from the Institute of Cancer Research of the Canadian Institutes of Health Research, in collaboration with C17 Council, Canadian Cancer Society, Cancer Research Society, Garron Family Cancer Centre at the Hospital for Sick Children, Ontario Institute for Cancer Research, J.A. DeSeve Research Chair in Nutrition.

**Table 1. Anthropometric characteristics and treatment details of the participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>N (male)</b>	8 (4)	16 (8)	8 (4)	8 (4)
<b>Age (years)</b>	24.2 ± 2.0	24.3 ± 1.1	23.3 ± 1.6	25.4 ± 1.6
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.5 ± 0.8	25.3 ± 1.6	22.3 ± 1.0	28.2 ± 2.7
<b>Waist circumference (cm)</b>				
Men	87.0 ± 2.8	86.4 ± 4.9	79.1 ± 7.4	93.8 ± 4.6
Women	80.6 ± 2.7	88.1 ± 7.7	78.6 ± 2.9	97.5 ± 14.5
All	83.8 ± 2.2	87.2 ± 4.4	78.8 ± 3.7	95.6 ± 7.1 *
<b>Age at diagnosis (years)</b>	NA	8.5 ± 1.3	10.9 ± 1.8	6.2 ± 1.7
<b>Event-free remission (years)</b>	NA	13.6 ± 1.6	10.2 ± 1.1	17.1 ± 2.6
<b>Treatments</b>				
Chemotherapy only		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
Without cardioprotection	NA	1	1	0
With cardioprotection		1	1	0
N				
Radiotherapy only	A	0	0	0
N				
Chemotherapy + radiotherapy	A	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>6</b>
Without cardioprotection	N	5	1	4
With cardioprotection	A	7	5	2
<b>Cranial radiotherapy dose (Gy)</b>				
0	N	2	2	0
12	A	6	4	2
18	N	6	2	4
<b>Protocol administered</b>				
DFCI 1987-01	N	1	0	1
DFCI 1991-01	A	2	0	2
DFCI 1995-01	N	3	2	1
DFCI 2000-01	A	5	4	1
DFCI 2005-01	N	3	2	1
<b>Active smoking</b>	0	3	1	2

Data on anthropometrics were collected on ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). All survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). NA, non-applicable.

Results are presented as Mean ± SEM. BMI: body mass index, DFCII: Dana-Farber Cancer Institute, Gy: Gray; \*p<0.05 vs Healthy

**Table 2 : Metabolic characterization of the study participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>BP (mmHg)</b>				

Systolic	-	124 ± 4	117 ± 4	130 ± 7
Diastolic	-	72 ± 3	66 ± 3	77 ± 5
<b>FBG (mmol/L)</b>	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2
<b>OGTT (mmol/L)</b>				
30 min	-	8.5 ± 0.4	8.1 ± 0.5	8.9 ± 0.6
60 min	-	7.8 ± 0.6	6.5 ± 0.5	9.2 ± 0.9 *
120 min	-	5.9 ± 0.4	5.4 ± 0.3	6.4 ± 0.8
<b>MDA (pmol/ml)</b>	298 ± 49	685 ± 95 #	692 ± 172	678 ± 96
<b>CRP (mg/L)</b>	-	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.5	2.5 ± 0.7 *
<b>Number of MetS criteria</b>				
0	8	8	8	0
1	0	1	0	1
2	0	6	0	6
3	0	0	0	0
4	0	1	0	1

Data on metabolic status were collected on ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Mets was defined per the NCEP ATP III (SOURCE), with the following cut-offs: i) waist circumference > 88cm for women and > 102cm for men, ii) HDL-C < 1.29 mmol/L for women and <1.03 mmol/L for men, iii) systolic blood pressure >130 or diastolic >85 mmHg, iv) fasting blood glucose > 6.1mmol/L. Results are presented as Mean ± SEM. BP: blood pressure, CRP: C-reactive protein, FBG: fasting blood glucose, MDA : malondialdehyde, MetS : metabolic syndrome, OGTT : oral glucose tolerance test; #p<0.05 vs Controls, \*p<0.05 vs Healthy.

**Table 3 : Lipid profiles of the study participants**

	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
<b>TG (mmol/L)</b>	0.90 ± 0.08	1.30 ± 0.36	0.79 ± 0.10	1.82 ± 0.69
<b>TC (mmol/L)</b>	4.24 ± 0.15	4.46 ± 0.21	4.10 ± 0.22	4.82 ± 0.32
<b>LDL-C (mmol/L)</b>	2.27 ± 0.12	2.59 ± 0.16	2.22 ± 0.15	3.00 ± 0.20 ** ##
<b>HDL-C (mmol/L)</b>				
Men	1.41 ± 0.11	1.11 ± 0.09	1.29 ± 0.12	0.93 ± 0.03 *
Women	1.71 ± 0.08	1.42 ± 0.14	1.76 ± 0.11	1.07 ± 0.05 ** ##
All	1.56 ± 0.09	1.26 ± 0.09	1.53 ± 0.12	1.00 ± 0.04 ** ###
<b>Non-HDL-C (mmol/L)</b>	2.68 ± 0.15	3.20 ± 0.24	2.58 ± 0.14	3.82 ± 0.33 * ##
<b>Ratio TC/HDL-C</b>	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.3	2.8 ± 0.2	4.9 ± 0.4 *** ###

Lipid profiles were obtained from ALL survivors (n=16) and age- and gender-matched controls (n=8). ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Results are presented as Mean ± SEM. HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; TC: total cholesterol; TG: triglycerides; \*p<0.05 vs Controls; \*\*p<0.01 vs Controls; \*\*\*P<0.001 vs Controls; ##p<0.01 vs Healthy; ###p<0.001 vs Healthy.

**Table 4: HDL composition of ALL survivors and Controls**

% HDL	Controls	ALL Survivors		
		All	Healthy	Unhealthy
Triglycerides	1.95 ± 0.29	2.55 ± 0.89	1.33 ± 0.23	3.76 ± 1.72
Cholesterol				
Free	3.93 ± 0.21	3.33 ± 0.12 *	3.62 ± 0.09	3.04 ± 0.17 *** ##
Esterified	19.66 ± 1.12	17.51 ± 0.56	18.74 ± 0.64	16.28 ± 0.70 ** #
Phospholipids	29.83 ± 1.28	29.00 ± 0.96	29.12 ± 1.20	28.88 ± 1.59
Proteins	44.63 ± 1.55	47.62 ± 1.21	47.20 ± 1.40	48.05 ± 2.06
Weight ratio	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.01 *	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02

HDL of n=16 ALL survivors and n=8 gender- and age-matched healthy controls were characterized as described in Methods. ALL survivors were stratified in 2 groups according to their metabolic status as described in Methods (n=8/group). Results, expressed as percent of the total components, are presented as Mean ± SEM. \*p <0.05 vs Controls; \*\*p <0.01 vs Controls; \*\*\*p <0.001 vs Controls; #p<0.05 vs Healthy; ##p<0.01 vs Healthy.

**Table 5: Protein identification and distribution among the ALL and Control groups**

	Protein	Accession number	Number of exclusive unique peptides	% of sequence coverage	Group distribution				
					C	ALL survivors			Total
						All	H	U	
1	Alpha-1-antitrypsin	P01009	448	48.2 ± 6.7	8	16	8	8	24
2	Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	192	26.0 ± 4.9	8	16	8	8	24
3	Apolipoprotein A-I	P02647	3633	91.7 ± 1.2	8	16	8	8	24
4	Apolipoprotein A-II	P02652	1074	77.2 ± 3.9	8	16	8	8	24
5	Apolipoprotein A-IV	P06727	1030	75.8 ± 8.1	8	16	8	8	24
6	Apolipoprotein B	P04114	2635	27.8 ± 11.8	8	16	8	8	24
7	Apolipoprotein C-I	P02654	540	61.6 ± 7.1	8	16	8	8	24
8	Apolipoprotein C-II	P02655	257	76.2 ± 8.9	8	16	8	8	24
9	Apolipoprotein C-III	P02656	381	76.6 ± 2.5	8	16	8	8	24
10	Apolipoprotein C-IV	P55056	87	24.5 ± 7.5	8	16	8	8	24
11	Apolipoprotein D	P05090	337	43.6 ± 5.6	8	16	8	8	24
12	Apolipoprotein E	P02649	895	81.9 ± 5.8	8	16	8	8	24
13	Apolipoprotein F	Q13790	130	18.7 ± 3.8	8	16	8	8	24
14	Apolipoprotein J	P10909	409	36.1 ± 3.8	8	16	8	8	24
15	Apolipoprotein L1	O14791	446	39.0 ± 6.1	8	16	8	8	24
16	Apolipoprotein M	O95445	428	62.7 ± 10.4	8	16	8	8	24
17	Complement C3	P01024	284	9.7 ± 3.3	8	16	8	8	24
18	Fibrinogen alpha chain	P02671	601	38.7 ± 8.8	8	16	8	8	24
19	Fibrinogen beta chain	P02675	232	17.0 ± 5.6	8	16	8	8	24
20	Haptoglobin-related protein	P00739	281	36.0 ± 13.1	8	16	8	8	24
21	Hemoglobin subunit beta	P68871	225	67.7 ± 11.7	8	16	8	8	24
22	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase (LCAT)	P04180	188	24.1 ± 4.0	8	16	8	8	24

23	Serum paraoxonase/arylesterase 1 (PON1)	P27169	470	65.2 ± 9.6	8	16	8	8	24
24	Serum paraoxonase/lactonase 3 (PON3)	Q15166	165	33.6 ± 8.7	8	16	8	8	24
25	Retinol-binding protein 4	P02753	131	33.2 ± 17.4	8	16	8	8	24
26	Serum amyloid A1	P0DJI8	202	66.3 ± 13.0	8	16	8	8	24
27	Serum amyloid A2	PODJI9	59	47.1 ± 15.8	8	16	8	8	24
28	Serum amyloid A4	P35542	334	62.3 ± 6.7	8	16	8	8	24
29	Serum albumin	P02768	1623	82.8 ± 5.0	8	16	8	8	24
30	Vitamin D-binding protein	P02774	205	24.0 ± 9.1	8	16	8	8	24
31	Vitronectin	P04004	138	15.2 ± 4.0	8	16	8	8	24
32	Cholesteryl ester transfer protein (CETP)	P11597	78	9.5 ± 2.8	8	15	8	7	23
33	Complement C4-B	P0C0L5	200	7.5 ± 3.7	7	16	8	8	23
34	Platelet basic protein	P02775	129	41.9 ± 7.9	7	16	8	8	23
35	Phospholipid transfer protein (PLTP)	P55058	167	18.0 ± 7.3	8	15	8	7	23
36	Actin, cytoplasmic 1	P60709	217	39.5 ± 11.2	8	14	7	7	22
37	Anthrax toxin receptor 2	P58335	59	7.4 ± 3.6	8	14	7	7	22
38	Prenylcystein oxidase 1	Q9UHG3	185	22.1 ± 6.7	7	15	7	8	22
39	Transthyretin	P02766	146	62.0 ± 9.4	7	15	7	8	22
40	Hemoglobin subunit alpha	P69905	109	44.1 ± 14.9	5	15	8	7	20
41	Platelet factor 4	P02776	78	39.2 ± 12.5	6	14	7	7	20
42	Protein MENT	Q9BUN1	49	9.1 ± 1.5	6	14	8	6	20
43	Apolipoprotein H	P02749	80	15.9 ± 7.4	6	13	6	7	19
44	Apolipoprotein (a)	P08519	431	6.7 ± 3.8	6	12	6	6	18
45	Beta-Ala-His dipeptidase	Q96KN2	70	12.9 ± 5.2	6	12	6	6	18
46	Keratinocyte differentiation-associated protein	P60985	31	27.4 ± 17.1	7	11	5	6	18
47	Proactivator polypeptide	P07602	28	4.5 ± 1.0	5	13	7	6	18
48	Haptoglobin	P00738	26	19.3 ± 7.7	4	13	7	6	17
49	Ig alpha-1 chain C region	P01876	58	15.3 ± 4.7	6	11	4	7	17
50	Keratin, type II cytoskeletal 1	P04264	183	18.5 ± 11.3	7	10	4	6	17
51	Keratin, type I cytoskeletal 9	P35527	162	21.7 ± 9.6	5	11	4	7	16
52	Apolipoprotein A-V	Q6Q788	51	17.6 ± 7.2	4	11	7	4	15
53	Fibrinogen gamma chain	P02679	44	11.3 ± 3.5	3	12	6	6	15
54	Protein AMBP	P02760	33	8.8 ± 2.6	4	11	6	5	15
55	Actin, alpha cardiac muscle 1	P68032	18	23.1 ± 4.8	3	11	5	6	14
56	Band 3 anion transport protein	P02730	41	7.1 ± 3.2	2	10	4	6	12
57	Filamin-A	P21333	58	3.7 ± 2.0	2	10	5	5	12
58	Gelsolin	P06396	27	6.1 ± 2.1	3	8	2	6	11
59	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	Q8NBP7	17	3.2 ± 0.5	5	6	4	2	11
60	Carbonic anhydrase 6	P23280	25	11.9 ± 2.8	4	5	2	3	9
61	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q14624	56	8.8 ± 2.3	4	5	3	2	9
62	Talin-1	Q9Y490	44	3.3 ± 2.1	3	6	3	3	9
63	UPF0669 protein C6orf120	Q7Z4R8	13	18.0 ± 7.8	4	5	2	3	9

64	Complement component C9	P02748	20	4.8 ± 1.2	2	6	4	2	8
65	Serotransferrin	P02787	66	13.8 ± 10.6	1	7	4	3	8
66	Tissue factor pathway inhibitor	P10646	14	13.4 ± 4.5	0	8	2	6	8
67	Angiotensinogen	P01019	17	6.7 ± 1.2	1	6	3	3	7
68	Cathelicidin antimicrobial peptide	P49913	24	20.0 ± 3.1	3	4	2	2	7
69	Homeobox protein Nkx-2.4	Q9H2Z4	18	2.8 ± 0.0	3	4	1	3	7
70	Multimerin-2	Q9H8L6	13	3.8 ± 0.4	0	7	4	3	7
71	Plasma protease C1 inhibitor	P05155	10	4.1 ± 1.0	2	5	3	2	7
72	Fibronectin	P02751	9	1.6 ± 0.7	0	6	3	3	6
73	Keratin type 1, cytoskeletal 10	P13645	16	14.7 ± 9.9	3	3	1	2	6
74	Alpha-2-antiplasmin	P08697	13	7.4 ± 1.8	3	2	1	1	5
75	Beta-2-microglobulin	P61769	13	23.3 ± 12.6	1	4	1	3	5
76	Complement factor D	P00746	10	16.0 ± 1.6	1	4	2	2	5
77	Fibroblast growth factor-binding protein 2	Q9BYJ0	10	14.6 ± 5.4	1	4	2	2	5
78	Integrin alpha-IIb	P08514	21	7.2 ± 3.1	1	4	2	2	5
79	14-3-3 protein zeta/delta	P63104	14	19.5 ± 5.0	0	4	2	2	4
80	HLA class I histocompatibility antigen, A-24 alpha chain	P05534	33	33.5 ± 8.3	1	3	1	2	4
81	Ig kappa chain C region	P01834	7	26.3 ± 5.8	1	3	2	1	4
82	Integrin beta-1	P05556	7	3.8 ± 0.8	0	4	4	0	4
83	Integrin beta-3	P05106	15	6.7 ± 2.0	0	4	2	2	4
84	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	P35908	18	14.1 ± 8.5	2	2	1	1	4
85	Kininogen-1	P01042	11	4.5 ± 1.0	3	1	0	1	4
86	Profilin-1	P07737	10	21.8 ± 8.8	2	2	2	0	4
87	Pulmonary surfactant-associated protein B	P07988	15	22.5 ± 10.5	1	3	2	1	4
88	SPARC-like protein 1	Q14515	8	5.9 ± 1.3	0	4	3	1	4
89	Hemoglobin subunit delta	P02042	6	57.0 ± 10.7	0	3	1	2	3
90	Hemopexin	P02790	6	10.2 ± 0.5	1	2	1	1	3
91	Indian hedgehog protein	Q14623	8	14.3 ± 3.6	0	3	1	2	3
92	Myosin-9	P35579	22	5.8 ± 5.5	0	3	1	2	3
93	Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH)	Q13093	7	6.8 ± 1.8	2	1	1	0	3
94	Protein Z-dependent protease inhibitor	Q9UK55	5	8.5 ± 3.3	1	2	2	0	3
95	Ras-related protein Rap-1b	P61224	6	12.0 ± 1.3	0	3	3	0	3
96	Thrombospondin-1	P07996	12	4.9 ± 2.1	0	3	2	1	3
97	CD99 antigen	P14209	4	23.0 ± 17.1	0	2	0	2	2
98	Cystatin-C	P01034	6	29.0 ± 4.0	1	1	0	1	2
99	Dermeidin	P81605	3	25.0 ± 6.0	0	2	0	2	2
100	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	7	18.0 ± 6.0	0	2	2	0	2
101	Ig gamma-1 chain C region	P01857	3	7.4 ± 2.6	0	2	2	0	2

102	Keratin, type 1 cytoskeletal 14	P02533	3	7.7 ± 1.6	2	0	0	0	2
103	L-selectin	P14151	7	8.8 ± 0.0	1	1	1	0	2
104	Pigment epithelium-derived factor	P36955	7	8.6 ± 5.5	0	2	1	1	2
105	Plasminogen	P00747	5	5.9 ± 0.6	1	1	0	1	2
106	Platelet glycoprotein Ib beta chain	P13224	4	5.4 ± 0.0	1	1	1	0	2
107	Trypsin-3	P35030	4	11.5 ± 1.5	1	1	1	0	2
108	Tubulin alpha-4A chain	P68366	7	12.0 ± 6.0	0	2	2	0	2
109	Alpha-2-macroglobulin	P01023	5	6.5	1	0	0	0	1
110	Alpha-actinin-1	P12814	6	9.2	0	1	1	0	1
111	Angiopoietin-related protein 3	Q9Y5C1	2	8.0	1	0	0	0	1
112	Ankyrin-1	P16157	2	2.7	0	1	0	1	1
113	Anthrax toxin receptor 1	Q9H6X2	2	5.7	1	0	0	0	1
114	C4b-binding protein alpha chain	P04003	5	14.0	0	1	0	1	1
115	Coagulation factor XIII A chain	P00488	3	5.6	0	1	1	0	1
116	Cofilin-1	P23528	2	27.0	0	1	1	0	1
117	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	2	13.0	0	1	1	0	1
118	Glycogen phosphorylase, muscle form	P11217	5	11.0	0	1	0	1	1
119	GTP-binding protein SAR1a	Q9NR31	2	27.0	0	1	1	0	1
120	Integrin-linked protein kinase	Q13418	3	11.0	0	1	1	0	1
121	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	P02750	3	17.0	0	1	1	0	1
122	Multimerin-1	Q13201	2	2.5	0	1	1	0	1
123	Myosin light polypeptide 6	P60660	2	15.0	0	1	1	0	1
124	Peroxyredoxin-6	P30041	2	15.0	0	1	1	0	1
125	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	P80108	2	3.8	0	1	1	0	1
126	Pleckstrin	P08567	3	19.0	0	1	1	0	1
127	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	P14618	2	6.2	0	1	1	0	1
128	RUN domain-containing protein 3A	Q59EK9	2	1.7	0	1	0	1	1
129	Sonic hedgehog protein	Q15465	2	6.7	1	0	0	0	1
130	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	P55072	2	4.3	0	1	1	0	1
131	Tropomyosin alpha-3 chain	P06753	2	14.0	0	1	1	0	1
132	Trypsin-2	P07478	2	17.0	1	0	0	0	1
133	Tubulin beta-1 chain	Q9H4B7	3	12.0	0	1	1	0	1
134	Tubulin beta-2A chain	Q13885	2	11.0	0	1	1	0	1

Proteins from delipidated HDLs were identified using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Identification thresholds were: FDR <1%, minimum 2 peptides in a single sample. Results are presented as Mean ± SEM. Controls (C, n=8), Healthy (H, n=8), Unhealthy (U, n=8)

## REFERENCES

1. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2016. Société canadienne du cancer: Toronto (Ontario).
2. Sorensen, J.T., et al., Effect of age on survival in acute leukemia. 1950-1990. *Cancer*, 1993. 72(5): p. 1602-6.
3. Phillips, S.M., et al., Survivors of childhood cancer in the United States: prevalence and burden of morbidity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015. 24(4): p. 653-63.
4. Oeffinger, K.C., et al., Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med*, 2006. 355(15): p. 1572-82.
5. Landier, W., S. Armenian, and S. Bhatia, Late effects of childhood cancer and its treatment. *Pediatr Clin North Am*, 2015. 62(1): p. 275-300.
6. Ellison, L.F., et al., Canadian cancer statistics at a glance: cancer in children. *CMAJ*, 2009. 180(4): p. 422-4.
7. de Haas, E.C., et al., The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol*, 2010. 11(2): p. 193-203.
8. Thomas-Teinturier, C. and S. Salenave, [Endocrine sequelae after treatment of pediatric cancer: From childhood to adulthood]. *Bull Cancer*, 2015. 102(7-8): p. 612-21.
9. Liao, K.P., et al., The association between reduction in inflammation and changes in lipoprotein levels and HDL cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis. *J Am Heart Assoc*, 2015. 4(2).
10. Gunn, H.M., et al., Metabolic Health in Childhood Cancer Survivors: A Longitudinal Study in a Long-Term Follow-Up Clinic. *J Adolesc Young Adult Oncol*, 2016. 5(1): p. 24-30.
11. Ishikawa, T., et al., High-density lipoprotein cholesterol efflux capacity as a relevant predictor of atherosclerotic coronary disease. *Atherosclerosis*, 2015. 242(1): p. 318-22.
12. Awad, F., et al., [Antioxidant Dysfunctionality of High-Density Lipoproteins (Hdl) in Decompensated Diabetic Patients]. *Nutr Hosp*, 2015. 32(3): p. 1131-8.
13. Soran, H., J.D. Schofield, and P.N. Durrington, Antioxidant properties of HDL. *Front Pharmacol*, 2015. 6: p. 222.
14. Nofer, J.R., et al., Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem*, 2001. 276(37): p. 34480-5.
15. Ansell, B.J., et al., Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation*, 2003. 108(22): p. 2751-6.

16. Tolle, M., et al., High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovasc Res*, 2012. 94(1): p. 154-62.
17. Tolle, M., et al., HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(8): p. 1542-8.
18. Adams, V., et al., Exercise training in patients with chronic heart failure promotes restoration of high-density lipoprotein functional properties. *Circ Res*, 2013. 113(12): p. 1345-55.
19. Luscher, T.F., et al., High-density lipoprotein: vascular protective effects, dysfunction, and potential as therapeutic target. *Circ Res*, 2014. 114(1): p. 171-82.
20. Viswambharan, H., et al., Reconstituted high-density lipoprotein inhibits thrombin-induced endothelial tissue factor expression through inhibition of RhoA and stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt/endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*, 2004. 94(7): p. 918-25.
21. Singh, S.A. and M. Aikawa, Unbiased and targeted mass spectrometry for the HDL proteome. *Curr Opin Lipidol*, 2017. 28(1): p. 68-77.
22. Shah, A.S., et al., Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *J Lipid Res*, 2013. 54(10): p. 2575-85.
23. Shroff, R., et al., HDL in children with CKD promotes endothelial dysfunction and an abnormal vascular phenotype. *J Am Soc Nephrol*, 2014. 25(11): p. 2658-68.
24. Shao, B., et al., A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects. *J Proteome Res*, 2015. 14(7): p. 2792-806.
25. Sampaio, E., et al., Impaired antioxidant action of high density lipoprotein in patients with type 1 diabetes with normoalbuminuria and microalbuminuria. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013. 99(3): p. 321-6.
26. Manjunatha, S., et al., Functional and proteomic alterations of plasma high density lipoproteins in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2016. 65(9): p. 1421-31.
27. Riwanto, M., et al., Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*, 2013. 127(8): p. 891-904.
28. Tan, Y., et al., Acute coronary syndrome remodels the protein cargo and functions of high-density lipoprotein subfractions. *PLoS One*, 2014. 9(4): p. e94264.
29. Cohen, E., et al., Human carotid atherosclerotic plaque protein(s) change HDL protein(s) composition and impair HDL anti-oxidant activity. *Biofactors*, 2016. 42(1): p. 115-28.

30. Marsillach, J., et al., Paraoxonase-3 is depleted from the high-density lipoproteins of autoimmune disease patients with subclinical atherosclerosis. *J Proteome Res*, 2015. 14(5): p. 2046-54.
31. Vrooman, L.M., et al., The low incidence of secondary acute myelogenous leukaemia in children and adolescents treated with dexrazoxane for acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. *Eur J Cancer*, 2011. 47(9): p. 1373-9.
32. Marcoux, S., et al., The PETALE study: Late adverse effects and biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *Pediatr Blood Cancer*, 2016.
33. Leung, A.A., et al., Hypertension Canada's 2016 Canadian Hypertension Education Program Guidelines for Blood Pressure Measurement, Diagnosis, Assessment of Risk, Prevention, and Treatment of Hypertension. *Can J Cardiol*, 2016. 32(5): p. 569-88.
34. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, 1972. 18(6): p. 499-502.
35. Genest, J., et al., 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can J Cardiol*, 2009. 25(10): p. 567-79.
36. Morel, S., et al., Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors. *J Lipid Res*, 2017.
37. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
38. Bartlett, G.R., Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 1959. 234(3): p. 466-8.
39. Deckelbaum, R.J., et al., Plasma triglyceride determines structure-composition in low and high density lipoproteins. *Arteriosclerosis*, 1984. 4(3): p. 225-31.
40. Bylda, C., et al., Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, 2014. 139(10): p. 2265-76.
41. Favari, E., et al., Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport, in *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation*, A. von Eckardstein and D. Kardassis, Editors. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 181-206.
42. Matsuo, Y., et al., Impaired HDL function in obese adolescents: impact of lifestyle intervention and bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring)*, 2013. 21(12): p. E687-95.
43. Vaziri, N.D., HDL abnormalities in nephrotic syndrome and chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 2016. 12(1): p. 37-47.

44. Watanabe, J., et al., Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(6): p. 1828-37.
45. Holzer, M., et al., Dialysis Modalities and HDL Composition and Function. *J Am Soc Nephrol*, 2015. 26(9): p. 2267-76.
46. Holzer, M., et al., Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res*, 2012. 53(8): p. 1618-24.
47. Kuliszkievicz-Janus, M., R. Malecki, and A.S. Mohamed, Lipid changes occurring in the course of hematological cancers. *Cell Mol Biol Lett*, 2008. 13(3): p. 465-74.
48. Giordano, P., et al., Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *Int J Cardiol*, 2017. 228: p. 621-627.
49. Halton, J.M., et al., Blood lipid profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 1998. 83(2): p. 379-84.
50. Yavasoglu, I., et al., Cholesterol Levels in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Natl Med Assoc*, 2017. 109(1): p. 23-27.
51. Garcia-Sanchez, C., et al., Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta*, 2011. 412(3-4): p. 292-8.
52. Medina-Urrutia, A., et al., Abnormal high-density lipoproteins in overweight adolescents with atherogenic dyslipidemia. *Pediatrics*, 2011. 127(6): p. e1521-7.
53. Hermans, M.P., et al., Size, density and cholesterol load of HDL predict microangiopathy, coronary artery disease and beta-cell function in men with T2DM. *Diabetes Metab Syndr*, 2016.
54. Juarez-Rojas, J., et al., High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2008. 17(11): p. 981-7.
55. Medina-Urrutia, A., et al., High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis*, 2008. 201(2): p. 392-7.
56. Posadas-Sanchez, R., et al., Premature and severe cardiovascular disease in a Mexican male with markedly low high-density-lipoprotein-cholesterol levels and a mutation in the lecithin:cholesterol acyltransferase gene: a family study. *Int J Mol Med*, 2014. 33(6): p. 1570-6.
57. Bekhet, O.H., et al., Hypertension, lipoprotein subclasses and lipid transfer proteins in obese children and adolescents. *Scand J Clin Lab Invest*, 2016. 76(6): p. 472-8.
58. Alwaili, K., et al., The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1821(3): p. 405-15.

59. Mange, A., et al., HDL proteome in hemodialysis patients: a quantitative nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e34107.
60. Weichhart, T., et al., Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(5): p. 934-47.
61. Yan, L.R., et al., A pro-atherogenic HDL profile in coronary heart disease patients: an iTRAQ labelling-based proteomic approach. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e98368.
62. Oberbach, A., et al., Proteome profiles of HDL particles of patients with chronic heart failure are associated with immune response and also include bacteria proteins. *Clin Chim Acta*, 2016. 453: p. 114-22.
63. Zhang, Q.H., et al., An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. 420(1): p. 17-23.
64. Mineo, C., et al., Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res*, 2006. 98(11): p. 1352-64.
65. Marsche, G., et al., Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther*, 2013. 137(3): p. 341-51.
66. Zabczyk, M., et al., High-density cholesterol and apolipoprotein AI as modifiers of plasma fibrin clot properties in apparently healthy individuals. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013. 24(1): p. 50-4.
67. Sibai, H., et al., Venous thromboembolism prevention during asparaginase-based therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Curr Oncol*, 2016. 23(4): p. e355-61.
68. Albayrak, M., et al., Alterations in procoagulant, anticoagulant, and fibrinolytic systems before and after start of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2013. 19(6): p. 644-51.
69. Sehgal, S., et al., Coagulation Profile at Diagnosis in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian J Pediatr*, 2016. 83(10): p. 1082-6.
70. Sehgal, S., et al., Coagulation profile during induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pathol Microbiol*, 2017. 60(1): p. 50-56.
71. Fisgin, T., et al., Hemostatic side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*, 2004. 21(1): p. 77-83.
72. Mulrooney, D.A., et al., Pilot study of vascular health in survivors of Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer*, 2012. 59(2): p. 285-9.
73. Freedman, D.S., et al., Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(7): p. 1046-53.
74. Murphy, A.J., et al., Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. 31(6): p. 1333-41.

75. Artl, A., et al., Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(3): p. 763-72.
76. Badolato, R., et al., Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 1994. 180(1): p. 203-9.
77. Zewinger, S., et al., Serum amyloid A: high-density lipoproteins interaction and cardiovascular risk. *Eur Heart J*, 2015. 36(43): p. 3007-16.
78. Rached, F., et al., Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochim Biophys Acta*, 2015. 1851(9): p. 1254-61.
79. Holzer, M., et al., Uremia alters HDL composition and function. *J Am Soc Nephrol*, 2011. 22(9): p. 1631-41.
80. Widlak, P., et al., Serum Proteome Signature of Radiation Response: Upregulation of Inflammation-Related Factors and Downregulation of Apolipoproteins and Coagulation Factors in Cancer Patients Treated With Radiation Therapy--A Pilot Study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015. 92(5): p. 1108-15.
81. Wang, J., et al., Inflammatory serum proteins are severely altered in metastatic gastric adenocarcinoma patients from the Chinese population. *PLoS One*, 2015. 10(4): p. e0123985.

## **Chapitre 4 : Évaluation de la fonctionnalité des HDLs de survivants de la LLA pédiatrique**

Le troisième sous-objectif a nécessité la mise au point de protocoles permettant de mesurer l'efflux de cholestérol médié par les HDLs, ainsi qu'un protocole pour mesurer leur capacité antioxydante.

Les sous-fractions HDL<sub>2</sub> et HDL<sub>3</sub> ont été isolées au début de la première phase du projet Pétale, tandis que les HDLs totales ont été isolées pour la fin de la première phase et pour la deuxième phase, car l'isolation des HDL<sub>2</sub> et des HDL<sub>3</sub> était trop exigeante en termes de temps, de main d'œuvre et de matériel. Ainsi, une distinction sera faite au niveau de la présentation des résultats, entre la sous-fraction HDL<sub>3</sub> et les HDLs totales. Les HDLs totales ayant été utilisées pour faire les travaux sur la protéomique et ayant été décrites dans l'article au Chapitre 1, les méthodes et résultats ne seront pas répétés ici.

### **Méthodologie**

#### **Sélection des participants pour les tests avec les HDL<sub>3</sub>**

Parmi les participants dont les HDL<sub>3</sub> ont été isolées, 10 duos sain-non sain, pairés pour l'âge et le genre, ont pu être identifiés. La caractérisation des participants a été réalisée tel que décrit dans le Chapitre 1. Il est important de noter que le volet du projet Pétale regardant les habitudes alimentaires des participants n'en était qu'à ses premiers balbutiements au moment de réaliser cette étude. Les données de consommation alimentaire n'ont donc pas pu être utilisées comme critère lors de la classification des participants dans les groupes « sains » et « non sains », ni être corrélées avec nos résultats de composition et de fonctionnalité des HDLs. Le questionnaire de fréquence développé spécifiquement pour le projet doit tout d'abord être validé (un article est en préparation à ce sujet); ensuite seulement les apports nutritionnels des participants pourront-ils être quantifiés et incorporés dans des modèles d'analyse plus approfondis.

Un groupe contrôle n'a pas pu être utilisé dans les expériences avec HDL<sub>3</sub> par manque d'échantillons et de volontaires comparables.

## **Isolation et composition des lipoprotéines**

Les HDL<sub>3</sub> ( $d= 1.125-1.21$  g/ml) ont été isolées tel que décrit au Chapitre 1, de même pour les techniques d'analyse de leur composition en protéines, TG, CL, CE et PL.

Les lipoprotéines de basse densité (LDLs) ( $d= 1.019-1.063$  g/ml) provenant de volontaires en santé ont été isolées suite à une ultracentrifugation de 18h, puis dessalées par une dialyse de 24 heures contre un tampon PBS-EDTA et conservées à 4°C.

## **Mesure de la capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol**

La capacité des HDLs des survivants à promouvoir l'efflux de cholestérol a été évaluée à l'aide de deux modèles, soit les cellules CaCo-2/15 (représentant des cellules d'organes périphériques), et les cellules THP-1 (représentant les macrophages capables de se transformer en cellules spumeuses).

### **Mesure de l'efflux de cholestérol médié par les HDLs - modèle de cellules périphériques**

Les cellules de la lignée cellulaire intestinale CaCo-2/15 ont été mises en culture dans des flasques T-75 (Corning, USA) contenant du Minimum Essential Medium Eagle's (modifié) & L-glutamine (EMEM) (Wisent, Canada), supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% d'acides aminés non essentiels, 100 U/ml de Pénicilline et 100 µg/ml de Streptomycine (Life Technologies, USA). À 80% de confluence, les cellules ont été trypsinisées (Life Technologies, USA) et ensemencées sur des membranes de polyester (Transwell, pores de 0.4 µm, 24mm de diamètre, Corning, USA) à une densité de  $1 \times 10^6$  cellules par puits. Le milieu de culture était remplacé à chaque 2 jours pendant les 3 semaines que dure la différenciation en entérocytes matures. Les cultures cellulaires ont été conservées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO<sub>2</sub> et utilisées entre les passages 19 et 25.

Au 21<sup>e</sup> jour après l'ensemencement, les cellules CaCo-2/15 furent marquées au cholestérol radioactif par une incubation avec le milieu de culture apical contenant des micelles de [1,2 <sup>3</sup>H (N)]-cholestérol, à raison de 0,45 µCi par puits. Après 24 heures d'incubation, le milieu fut retiré et toute la radioactivité non incorporée fut éliminée par 3 rinçages au PBS. Les cellules furent ensuite incubées, pour 18 heures, en présence de 35 µg protéines/ml d'accepteurs de cholestérol (HDLs totales ou HDL<sub>3</sub>) et de 2mM T0901317 (Cayman Chemicals, USA) en

basolatéral et de 0,1  $\mu\text{M}$  lomitapide mésylate (Selleck Chemicals, USA) en apical. Le T0901317, un agoniste du Liver X Receptor (LXR), augmente l'expression des transporteurs transmembranaires de cholestérol ABCA1 et ABCG1. Le lomitapide mésylate (BMS-201038) inhibe la protéine de transport des triglycérides microsomaux (MTP) et empêche donc la sécrétion de chylomicrons. À la fin de l'incubation, les milieux furent récoltés séparément, tandis que les cellules furent rincées 2 fois au PBS froid ( $4^{\circ}\text{C}$ ), lysées puis homogénéisées par des ultrasons avec un Sonifier 450 (Branson, USA). La quantité de cholestérol radioactif présent dans chaque échantillon fut évaluée en comptant le nombre de désintégrations du Tritium en 1 minute (dpm) à l'aide d'un compteur à scintillation liquide LS 6500 Multi-Purpose (Beckman Coulter, USA) et de liquide à scintillation Ecolite (MP Biomedicals, USA). La capacité des HDLs à promouvoir l'efflux de cholestérol fut calculée comme le pourcentage de radioactivité retrouvée dans le milieu basolatéral sur la radioactivité totale (milieu apical, milieu basolatéral et lysats cellulaires).

### **Mesure de l'efflux de cholestérol médié par les HDLs-modèle de macrophages**

Les cellules macrophagiques humaines THP-1 (ATCC TIB 202) ont été mises en culture dans des flasques T-75 (Corning, USA) contenant du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 avec L-glutamine et bicarbonate de sodium (RPMI 1640) supplémenté de 10% sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/ml de Pénicilline, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Streptomycine, 10 mM d'HEPES, 1mM de pyruvate de sodium, 0.36 mM de bicarbonate de sodium, 0.13 mM de D-glucose et 0.05 mM de 2-mercaptoéthanol. Leur densité était conservée dans l'intervalle 0,5 - 1,5  $\times 10^6$  cellules/ ml par l'addition de milieu de culture. Les monocytes ( $1 \times 10^6$  cellules/ ml) ont été mis en plaque puis différenciés en macrophages en 72 heures suite à l'addition de 100 ng/ml de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, USA). Les cultures cellulaires ont été conservées à  $37^{\circ}\text{C}$  dans une atmosphère humide avec 5%  $\text{CO}_2$ .

### *Oxydation et marquage des LDLs*

Les LDLs ont subi une 2<sup>e</sup> étape de dialyse dans un tampon 5 Mm TRIS-50 Mm NaCl (pH 7,4) pendant 24 heures afin d'en retirer l'EDTA. Elles ont ensuite été oxydées en présence de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) 10  $\mu\text{M}$  pendant 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$  avec agitation (99). L'oxydation fut stoppée par une 3<sup>e</sup> dialyse de 24 heures dans le tampon TRIS-NaCl. La peroxydation

lipidique a été confirmée en dosant le malondialdéhyde (MDA) libre, tel que décrit précédemment (100). Brièvement, les protéines furent précipitées par l'ajout d'une solution de tungstate de sodium 8% ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) et d'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 0,44M. Le surnageant fut ensuite incubé 1 heure à 95°C avec la même quantité d'une solution d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,5%. Le chromogène rose ainsi généré fut extrait au 1-butanol et évaporé sous azote, avant d'être resuspendu dans une phase mobile composée de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ / méthanol (70:30) et analysé par HPLC. Les LDL oxydés présentaient en moyenne 4500 pmol de MDA par mg de protéines.

Les oxLDLs furent ensuite marquées au cholestérol-tritié libre ( $[1,2 \text{ } ^3\text{H(N)}]$ -cholestérol) en présence de sérum ne contenant plus de lipoprotéines (LPDS) selon une méthode adaptée (101). Le LPDS est ajouté parce qu'il contient des facteurs qui facilitent l'incorporation du cholestérol libre (marqué) dans les lipoprotéines. Les oxLDLs furent incubées à 37°C avec agitation pendant 24 heures en présence de 5 ml de LPDS et 50  $\mu\text{Ci}$  de cholestérol radioactif, puis les  $^3\text{H}$ -oxLDLs furent isolées par ultracentrifugation.

Les macrophages furent incubés avec les  $^3\text{H}$ -oxLDLs (0.2  $\mu\text{Ci}$ / puits) pendant 24 heures, puis le milieu fut retiré, les cellules rincées avec 5 ml de PBS et du nouveau milieu fut ajouté pour 24 heures d'équilibration. L'efflux de cholestérol médié par les HDLs (35 $\mu\text{g}$  protéines/ml) fut mesuré, suite à une dernière incubation de 18 heures, comme le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le milieu sur la radioactivité totale. Les déchets cellulaires furent préalablement retirés du milieu par une centrifugation de 10 minutes à 4000g (102).

## **Mesure du potentiel antioxydant des HDLs**

La capacité des HDLs d'inactiver les oxLDLs a été mesurée selon la technique développée par Navab et collègues (103). L'avantage de cette technique est qu'elle n'implique pas de culture cellulaire, ce qui réduit énormément les coûts, les délais et la variabilité. Brièvement, les HDLs sont incubées avec des oxLDLs, puis la molécule émettant la fluorescence est ajoutée. Si les HDLs neutralisent les lipides peroxydés des oxLDLs, la lecture de fluorescence sera faible. Dans le cas contraire, les HDLs pro-oxydantes vont entraîner une lecture élevée. La molécule fluorescente choisie est la dichlorodihydrofluoresceine diacétate (DCFH-DA) (Cayman Chemicals, USA). Préalablement à l'essai, elle fut solubilisée dans le méthanol à une concentration de 0.2 mg/ml, puis agitée pendant 30 minutes à température pièce,

dans le noir. Cette étape entraîne la dissociation du groupement diacétate, ce qui rend la dichlorohydrofluoresceine (DCFH) particulièrement sensible à l'oxydation. Lorsqu'oxydée, la DCFH devient DCF, et émet un signal fluorescent intense. Les HDLs des patients et les oxLDLs (20 µg de protéines de chaque) furent pipetées dans une plaque de polystyrène noire à 96 puits. Du salin fut ajouté pour avoir un volume total de 100 µl, puis la plaque fut recouverte pour la protéger de la lumière, et agitée à 37°C. Après 1 heure d'incubation, la DCFH fut ajoutée (10 µl par puits) et l'incubation continuée pour 2 heures supplémentaires. L'intensité de la fluorescence fut mesurée dans un lecteur de plaque monochromateur Spectramax i3x (Molecular Devices, USA) aux longueurs d'ondes 485 +/- 9 nm et 535 +/- 15 nm respectivement pour l'excitation et l'émission. Les plaques utilisées pour cet essai entraînent une lecture de base inférieure aux plaques traditionnelles de par leur matériel faiblement auto-fluorescent et l'épaisseur réduite du fond des puits, en plus de limiter la contamination entre les puits avoisinants (*crosstalk*) puisque la couleur noire absorbe les rayons déviés qui ne se rendent pas au détecteur. L'indice antioxydant des HDLs fut calculé comme le ratio entre la lecture de fluorescence des conditions (HDL + oxLDL) / oxLDL. Un indice supérieur à 1 indique des HDLs pro-oxydantes, tandis qu'un indice inférieur à 1 est le signe de HDLs antioxydants.

### **Analyses statistiques**

Les résultats sont présentés sous la forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). La normalité des distributions a été vérifiée de façon systématique. Les tests paramétriques (t-test de Student, t-test de Student pour données appariées, ANOVA à un facteur pour mesures répétées avec analyse *post hoc* de Newman-Keuls) ou non paramétriques (test de U de Mann Whitney, test de Wilcoxon, test de Friedman avec analyse *post hoc* de Dunn) ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prisme version 5,01. Une valeur de *p* inférieure à 0,05 a été considérée significative.

## Résultats

### Caractéristiques des participants

Les participants dont les HDLs totales ont été étudiées sont décrits au Chapitre 1. Pour les participants dont les HDL<sub>3</sub> ont été étudiées, leurs caractéristiques anthropométriques et métaboliques sont présentées au **Tableau II** (page 94), tandis que les détails de leurs traitements sont présentés dans le **Tableau III** (page 95). La seule différence statistiquement significative concerne les niveaux de HDL-C (lorsqu'on ne fait pas de distinction du genre), qui sont évidemment plus bas chez les survivants métaboliquement non sains. Le très petit nombre de sujets ne nous a pas donné la puissance statistique pour confirmer d'autres différences entre les groupes, bien qu'il y ait une tendance à ce que les survivants non sains aient une CRP plus élevée. Les survivants non sains masculins auraient également une tendance à avoir un tour de taille supérieur à celui des hommes sains.

**Tableau II.** Bilan anthropométrique et métabolique des participants dont les HDL<sub>3</sub> ont été isolées

	Survivants	
	Sains	Non sains
<b>N (hommes)</b>	5 (3)	5 (3)
<b>Âge (années)</b>	22,1 ± 2,6	22,6 ± 1,5
<b>Indice de masse corporelle (kg/m<sup>2</sup>)</b>	20,6 ± 0,4	26,4 ± 1,8
<b>Tour de taille (cm)</b>		
Hommes	79.8 ± 0.6	99.5 ± 4.8
Femmes	76.5 ± 0.5	76.8 ± 4.8
Tous	78,5 ± 0,9	90,4 ± 7,3
<b>Pression artérielle (mmHg)</b>		
Systolique	118 ± 3	120 ± 5
Diastolique	66 ± 4	67 ± 2
<b>Glycémie à jeun (mmol/L)</b>	5,0 ± 0,2	5,5 ± 0,2
<b>Insuline à jeun (U/L)</b>	61,0 ± 16,3	55,4 ± 8,8
<b>HbA<sub>1c</sub></b>	0,052 ± 0,001	0,049 ± 0,001
<b>Nombre de facteurs du MetS</b>		
0	5	0
1	0	3
2	0	1
3	0	1
4	0	0
<b>CRP (mg/L)</b>	1,0 ± 0,3	4,6 ± 2,8
<b>Bilan lipidique</b>		
<b>Cholestérol total (mmol/L)</b>	3,89 ± 0,17	4,39 ± 0,34
<b>TG (mmol/L)</b>	0,76 ± 0,09	1,04 ± 0,16
<b>LDL-C (mmol/L)</b>	2,14 ± 0,13	2,99 ± 0,29
<b>HDL-C (mmol/L)</b>		
Hommes	1,34 ± 0,05 (n=3)	0,90 ± 0,03 (n=3)
Femmes	1,50 ± 0,05 (n=2)	1,10 ± 0,15 (n=2)
Tous	1,40 ± 0,05 (n=5)	0,98 ± 0,07 ** (n=5)
<b>Non-HDL-C (mmol/L)</b>	2,49 ± 0,13	3,41 ± 0,30
<b>Ratio CT/HDL-C</b>	2,8 ± 0,1	4,5 ± 0,3

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± SEM. HbA<sub>1c</sub> : Hémoglobine glyquée, MetS : Syndrome métabolique, CRP : Protéine réactive C. \*\* p< 0.01

Au niveau des traitements, les survivants ont été diagnostiqués à un âge semblable et présentent un temps de rémission comparable. Les informations précises concernant les traitements n'étaient disponibles que pour 8 des 10 sujets. Comparativement à la population décrite au Chapitre 1, dans cette population seulement 25% des patients ont reçu une cardioprotection

concomitante à leur chimiothérapie. Il n'y a pas de tendance spécifique au niveau de l'administration ou non de radiothérapie ou du protocole suivi.

**Tableau III.** Détails des traitements reçus par les participants (HDL<sub>3</sub>)

	Survivants	
	Sains	Non sains
<b>Âge au diagnostic</b> (années)	6,4 ± 2,3	7,9 ± 2,2
<b>Temps de rémission</b> (années)	14,0 ± 3,3	12,6 ± 2,7
<b>Traitements</b> (n=4 par groupe)		
Chimiothérapie seulement	<b>2</b>	<b>1</b>
Sans cardioprotection	2	1
Avec cardioprotection	0	0
Radiothérapie seulement	0	0
Chimiothérapie et radiothérapie	<b>2</b>	<b>3</b>
Sans cardioprotection	1	2
Avec cardioprotection	1	1
<b>Dose de radiothérapie crânienne (Gy)</b>		
0	2	1
12	1	1
18	1	2
<b>Protocole administré</b>		
DFCI 1987-01	2	1
DFCI 1991-01	0	0
DFCI 1995-01	1	3
DFCI 2000-01	1	0
DFCI 2005-01	1	1

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± SEM.

## Composition des lipoprotéines

La composition des HDLs totales est présentée et discutée au Chapitre 1. La composition des HDL<sub>3</sub> est présentée au **Tableau IV** (page 96). Il n'y a aucune différence statistiquement significative entre la composition des HDL<sub>3</sub> des survivants sains et celles des survivants non sains.

**Tableau IV.** Composition des HDL<sub>3</sub>

% des HDL <sub>3</sub>	Survivants	
	Sains	Non sains
Triglycérides	2.32 ± 0.12	2.53 ± 0.36
Cholestérol Libre	1.91 ± 0.21	2.38 ± 0.40
Estérifié	17.76 ± 1.60	13.71 ± 1.34
Phospholipides	24.41 ± 1.95	22.99 ± 2.38
Protéines	53.59 ± 3.72	57.19 ± 3.11
Ratio de masse	0.25 ± 0.03	0.20 ± 0.02

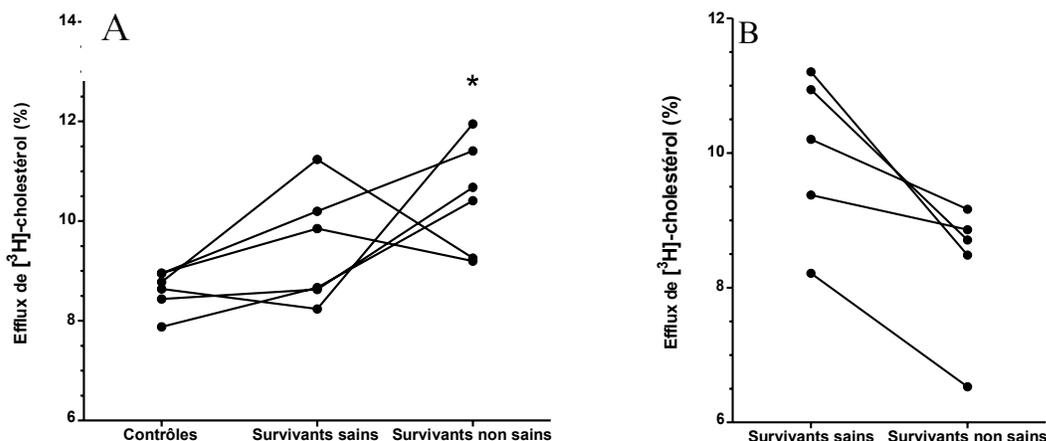
Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne ± SEM.

## Mesure de l'efflux de cholestérol médié par les HDLs

### Modèle de cellules périphériques

La capacité des HDLs totales et des HDL<sub>3</sub> à promouvoir l'efflux de cholestérol à partir de cellules périphériques a été mesurée à l'aide de cellules de la lignée CaCo-2/15 différenciées en entérocytes et préalablement chargées de cholestérol radioactif (<sup>3</sup>H-cholestérol) (**Figure 9**, page 97). Afin que la quantité de transporteurs membranaires de cholestérol ne représente pas un facteur limitant dans l'expérience, leur expression fut stimulée par l'addition de T0901317 au milieu d'incubation (en basolatéral, avec les lipoprotéines). Le BMS-201038 (inhibiteur de la MTP) fut quant à lui ajouté au milieu apical, afin que le <sup>3</sup>H-cholestérol ne soit pas incorporé et sécrété sous forme de chylomicrons. Nous ne pouvions par contre pas prévenir la diffusion passive du <sup>3</sup>H-cholestérol dans les milieux basolatéraux et apicaux, c'est pourquoi quelques puits furent systématiquement incubés sans lipoprotéines. L'efflux de <sup>3</sup>H-cholestérol dans ces puits, indépendant des HDLs, fut calculé et cette valeur fut soustraite de l'efflux mesuré en présence des lipoprotéines.

**Figure 9.** Mesure de l'efflux de cholestérol à partir des cellules CaCo-2/15



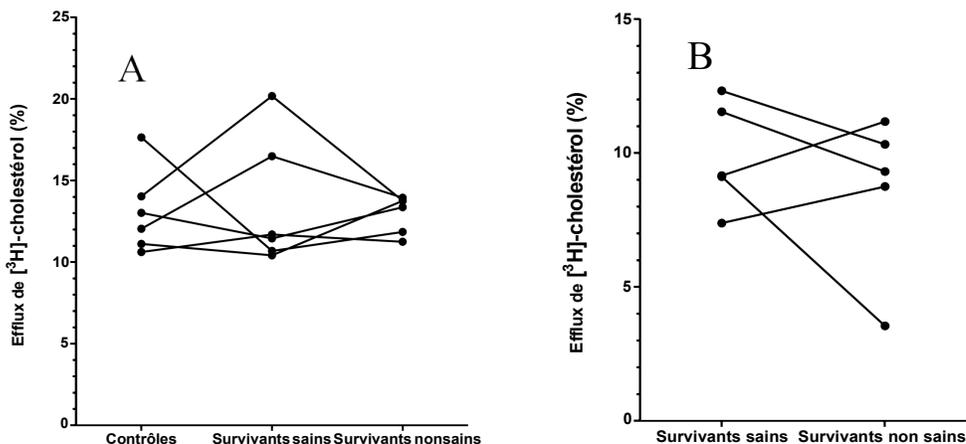
Efflux de cholestérol médium par (A) les HDLs totales (35 µg protéines/ml) et (B) les HDL<sub>3</sub> (35 µg protéines/ml) suite à une incubation de 18 heures. \* $p < 0.05$  vs Contrôles

Les HDLs totales des survivants non sains ont réalisé un efflux significativement plus élevé que les HDLs des contrôles (10,49% vs 8,61%,  $p=0,0289$ ). À l'inverse, l'efflux médium par les HDL<sub>3</sub> des survivants non sains semble inférieur à celui réalisé par les HDL<sub>3</sub> des survivants sains, mais la différence n'est pas statistiquement significative, partiellement dû au petit nombre d'échantillons (8,35% vs 9,99%,  $p=0,0625$ ).

### Modèle de macrophages

La capacité des HDLs à promouvoir l'efflux de cholestérol à partir de macrophages donne des résultats très variables (**Figure 10**, page 98). Autant pour les HDLs totales que pour les HDL<sub>3</sub>, exactement la moitié des duos et trios présente un efflux supérieur chez les survivants sains et les contrôles, et l'autre moitié présente un efflux supérieur chez les survivants non sains. Il n'y a définitivement pas de différence statistique entre les groupes (test de Friedman pour les HDLs totales :  $p=0,9563$  ; test de Wilcoxon pour les HDL<sub>3</sub> :  $p=0,4375$ ).

**Figure 10.** Mesure de l'efflux de cholestérol à partir des cellules THP-1

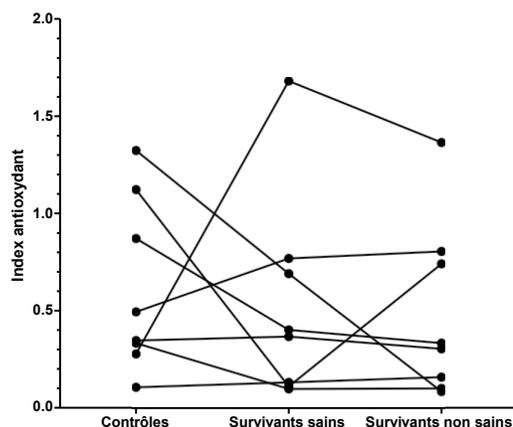


Efflux de cholestérol médié par (A) les HDLs totales (35 µg protéines/ml) et (B) les HDL<sub>3</sub> (35 µg protéines/ml) suite à une incubation de 18 heures.

## Mesure de la capacité antioxydante des HDLs

La fonction antioxydante des HDLs a été testée comme leur capacité à inactiver les hydroperoxydes lipidiques, spécifiquement sur des LDLs oxydées avec une solution de sulfate de cuivre. L'incubation finale est faite avec la molécule DCFH, qui émet un signal fluorescent intense lorsqu'en contact avec des molécules peroxydées. Le ratio de l'intensité du signal émis suite à l'incubation d'oxLDLs avec des HDLs sur l'intensité du signal émis par des oxLDLs seules donne un indice du potentiel antioxydant des HDLs. En effet, des HDLs antioxydantes réduiront l'activation de la DCFH et limiteront la fluorescence, ce qui donnera un indice antioxydant inférieur à 1, tandis que des HDLs pro-oxydantes augmenteront la fluorescence et auront un indice supérieur à 1. Les résultats du test avec les HDLs totales sont représentés à la **Figure 11** (page 99). La grande majorité des HDLs (83%) sont effectivement antioxydantes, avec seulement 4 sujets dont les HDLs sont pro-oxydantes. Parmi ces 4 sujets, 2 sont des contrôles, 1 est un survivant sain, et 1 est un survivant non sain.

**Figure 11.** Mesure de la fonction antioxydante des HDLs totales.



La capacité de 20 µg de HDLs à inactiver les hydroperoxydes présentes sur 20 µg d'oxLDLs en une incubation de 2 heures, suivie par 1 heure d'incubation avec 0,2 mg/ml de DCFH.

Les moyennes des indexes sont légèrement inférieures chez les survivants par rapport aux contrôles, mais encore une fois il n'y a rien de statistiquement significatif ( $0,60 \pm 0,16$  pour les contrôles;  $0,53 \pm 0,19$  pour les survivants sains;  $0,49 \pm 0,16$  pour les survivants non sains; test de Friedman :  $p = 0,9674$ ).

.....

## Chapitre 5 : Discussion

Pour répondre aux 2 premiers sous-objectifs de ce travail, nous avons caractérisé les compositions générale et protéomique de HDLs isolées de jeunes survivants de la LLA et les avons comparées à celles des HDLs de sujets contrôles. Nos résultats indiquent que ces HDLs ont un métabolisme altéré ainsi qu'une modification de leur protéome affectant particulièrement leurs fonctions anti-thrombotiques, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires.

Les HDLs des survivants avaient une composition anormale, démontrée par une réduction de leur contenu en cholestérol libre et estérifié comparativement aux contrôles. Ils présentaient également certaines protéines qui n'ont pas été détectées dans les échantillons des contrôles; la majorité de ces protéines sont pro-thrombotiques ou pro-apoptotiques. Finalement, comparativement aux contrôles, les HDLs des survivants non sains contenaient au moins deux fois plus de fibrinogène et d'amyloïde sérique A, des protéines pro-thrombotiques et pro-inflammatoires. Le profil pro-athérogénique des survivants était régulièrement empiré par la présence de paramètres supplémentaires de dyslipidémie, comme des taux de LDL-C et de triglycérides élevés. Bien que quelques travaux aient déjà été réalisés sur les HDLs dans des contextes d'inflammation ou de maladies auto-immunes, à notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir investigué le protéome des HDLs de survivants de cancer, particulièrement dans la population pédiatrique.

Les HDLs jouent un rôle de premier plan dans le maintien de l'homéostasie et sont primordiales à la santé cardiométabolique. Leur action anti-athérosclérotique, par la promotion de l'efflux de cholestérol et son transport inverse jusqu'au foie d'où il sera converti en acides biliaires et majoritairement éliminé par les fèces, est leur fonction la plus connue et étudiée (48). Pourtant, les HDLs remplissent de nombreuses autres fonctions. En effet, elles sont anti-inflammatoires, anti-hypertensives, anti-apoptotiques, antioxydantes et anti-thrombotiques, en plus de participer à la régulation de la réponse immunitaire (42, 57, 59, 70, 73, 74, 80, 83). La multifonctionnalité des HDLs est rendue possible par leur contenu en lipides bioactives, mais surtout par leur grande variété de protéines. Une composition adéquate en lipides et protéines est primordiale au bon fonctionnement des HDLs; un déséquilibre de ces composantes est délétère à la santé cardiométabolique et cardiovasculaire (85, 104).

Il semblerait que la plupart des patients, au moment de recevoir un diagnostic de cancer, présentent des taux de HDL-C bas (98, 105-107), un signe que le métabolisme des HDLs est affecté, probablement dû à un changement de leur contenu en protéines. Bien que les traitements contre le cancer et l'entrée en rémission soient généralement associés avec une augmentation des niveaux de HDL-C (105), une proportion substantielle de survivants présentent un HDL-C bas même une fois en rémission (98). En plus des concentrations de HDL-C diminuées (5, 106), les survivants de la LLA présentent fréquemment des dérangements cardiométaboliques tels que l'obésité, l'hypertension et les dyslipidémies (5). Nous avons précédemment démontré que les survivants de LLA présentant une dyslipidémie ont des lipoprotéines dont la composition est altérée (5). Il est donc plausible que leurs HDLs soient métabolisées de façon inappropriée, suite à une composition protéique anormale, qui affecte aussi leur fonctionnalité. Étonnamment, cet aspect important n'a jamais été étudié chez les survivants de cancer.

Puisque la fonctionnalité des HDLs dépend fortement de leur contenu en protéines, nous avons appliqué les techniques de spectrométrie de masse pour investiguer le protéome de HDLs isolées de survivants de LLA pédiatrique. L'intérêt est grandissant pour les études de protéomique, dont l'approche directe en fait un outil intéressant pour l'identification précise de protéines dont l'expression est modulée. L'utilisation de la technologie fiable qu'est la protéomique, avec sa capacité à produire une grande quantité de résultats de qualité, permettrait non seulement d'améliorer l'état des connaissances et de mieux comprendre le métabolisme des HDLs dans la LLA, mais fournirait potentiellement de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic ou le traitement des patients et des survivants.

## **Composition générale des HDLs**

Notre premier résultat d'intérêt concerne la composition des HDLs des survivants de la LLA pédiatrique métaboliquement non sains, qui présentent une diminution de leur contenu en cholestérol libre et estérifié, mais un contenu normal en protéines, triglycérides et phospholipides. Cette diminution du contenu en cholestérol n'est pas inattendue dans le contexte des dyslipidémies caractérisant les survivants de la LLA, car cela a déjà été décrit dans des désordres métaboliques tels le syndrome métabolique (108), l'obésité (109) et le diabète (110), ou encore dans des pathologies complexes comme le lupus érythémateux (111) et les maladies

rénales avancées (104). Le type de cholestérol touché (libre ou estérifié) varie entre les études; nous sommes parmi les quelques groupes à rapporter une diminution des deux formes (109, 112). Une transition vers des HDLs plus petites est aussi observée par la majorité de ces groupes (104, 108, 109, 111, 112). Par contre, ils rapportent aussi un enrichissement des HDLs en triglycérides, ce que nous n'avons pas observé dans notre étude. Il semblerait donc que les survivants de cancers présentent un schéma d'altérations des HDLs distinct, défini par une diminution du contenu en cholestérol libre et estérifié sans enrichissement en triglycérides. Nos résultats concordent avec la transition vers de plus petites HDLs observée en conditions pathologiques, tel que démontré par un plus petit ratio de masse chez les survivants de LLA (5). Les causes d'un plus faible contenu en cholestérol dans les HDLs des survivants peuvent être multiples. Par exemple, une activité diminuée de la LCAT (104, 113), un faible efflux de cholestérol cellulaire (109, 113) et une activité anormalement élevée de la CETP (114) ont été identifiées comme responsables d'une diminution du contenu en cholestérol dans les HDLs, ce qui peut rendre celles-ci inefficaces à prévenir le développement de la plaque athéromateuse et des maladies cardiovasculaires. Étant donné la multitude de mécanismes différents pouvant réduire la capacité des HDLs à promouvoir l'efflux de cholestérol et affecter leur fonctionnalité, il est essentiel de se tourner vers l'approche protéomique, qui a l'avantage unique et significatif de pouvoir fournir le profil complet des protéines en une seule analyse, et permettra ensuite d'accélérer la recherche fonctionnelle sur les HDLs.

## **Analyse du protéome par spectrométrie de masse**

Dans un premier temps, nous avons comparé la protéomique des sujets contrôles aux données disponibles dans la littérature afin d'établir la robustesse de notre approche. Nous avons donc sélectionné 8 études sur la biologie du HDL qui ont isolé leurs échantillons par ultracentrifugation, ont décrit leur population adéquatement, incluaient un groupe contrôle, fournissaient l'entièreté de leurs résultats, tout en séparant ceux des contrôles et ceux des sujets pathologiques, et ont identifié un nombre intéressant de protéines (43, 57, 60, 77, 87, 115-117). Le nombre de protéines identifiées dans chaque étude varie de 49 à 190, tandis que nous en rapportons 134. Au total, 326 protéines ont été identifiées dans au moins une de ces études ou dans la nôtre, parmi lesquelles 171 n'ont été détectées qu'une seule fois. Nous avons identifié pour la première fois 7 protéines sur les HDLs, soit *actin alpha cardiac muscle 1, band 3 anion*

*transport protein, homeobox protein Nkx-2.4, keratinocyte differentiation-associated protein, trypsin-2, trypsin-3 et UPF0669 protein C6orf120*. Seulement 18 protéines ont été retrouvées dans toutes les études : 11 apolipoprotéines (A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D, E, J, L1, et M), ainsi que *complement C3, haptoglobin-related protein, phosphatidylcholine-sterol acyltransferase (LCAT), serum paraoxonase/ arylesterase 1 (PON1), phospholipid transfer protein (PLTP), serum amyloid A1/2 (SAA1/2), et la vitronectin*. La majorité de ces protéines des HDLs (15/18) sont impliquées dans le transport et le métabolisme des lipides. La seule protéine absente de notre étude, bien que présente dans les 8 autres investigations, est l'*alpha-1-acid-glycoprotein 2*. Cette protéine est impliquée dans la régulation du système immunitaire, de la réponse de phase aiguë et dans le transport de molécule non-lipidique. Il n'y a pas de raison spécifique pour laquelle nous n'avons pas retrouvé cette protéine dans notre étude. Il se pourrait que les peptides des protéines très abondantes aient masqué le signal pour cette protéine; il se peut aussi que la base de données utilisée pour identifier les peptides à partir des résultats de spectrométrie de masse entraîne une légère variation dans les protéines identifiées; après tout, nous ne sommes pas les seuls à ne pas avoir identifié cette protéine dans des HDLs. Finalement, il est aussi possible que nos critères d'identification aient été plus sévères que ceux des autres études, et aient considéré la protéine comme un faux-positif.

Finalement, des 115 protéines identifiées par au moins 3 groupes, 81 (70.4%) ont aussi été retrouvées dans notre étude. Les variations observées parmi les résultats peuvent émaner des différentes techniques et techniciens, des populations étudiées et des analyses informatiques.

### **Déséquilibre anti-/pro-thrombotique dans les HDLs des survivants**

Chez les sujets sains, les HDLs sont reconnues pour être anti-thrombotiques, puisqu'elles préviennent l'agrégation plaquettaire, régulent la cascade de coagulation, prolongent le temps de formation des thrombus et promeuvent la dégradation des caillots de fibrine. Les HDLs préviennent l'activation des plaquettes en induisant l'expression de 2 de leurs inhibiteurs, soit la prostacycline PGI<sub>2</sub> et le gaz oxyde nitrique (en augmentant l'activité de l'enzyme eNOS) (40). La protéine *platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH)*, présente sur les HDLs, participe également à cette activité en hydrolysant le facteur qui active les plaquettes. Finalement, les HDLs agissent à la fois sur la formation et la dégradation des

caillots de fibrine en réduisant la formation de thrombine et en stimulant la génération de plasmine (55, 68, 69). La thrombine, la forme active de la prothrombine, est responsable de transformer le fibrinogène en fibrine, une fibre insoluble et le composant principal des caillots. La plasmine, la forme active du plasminogène, est un élément clé de la fibrinolyse. Dans les états d'hypercoagulabilité, les fonctions anticoagulantes sont affaiblies, tandis que la fibrinolyse est ralentie.

Dans notre étude, de toutes les protéines identifiées, 46 (34%) participaient à la cascade de coagulation, ce qui en fait la 3<sup>e</sup> fonction la plus fréquente, devançant même le transport et le métabolisme des lipides. Treize protéines exprimées uniquement par les survivants de la LLA sont pro-thrombotiques, bien que la moitié de ces individus présentaient aussi la protéine anti-thrombotique *tissue factor pathway inhibitor*. La grande variété de protéines pro-thrombotiques retrouvée dans ces échantillons surpasse probablement les effets bénéfiques de cette protéine. Une de ces protéines pro-thrombotiques est la *thrombospondin-1*, qui est aussi pro-apoptotique et pro-inflammatoire. Cette protéine a été retrouvée dans les HDLs de patients souffrant de syndrome coronarien aigu, mais pas chez ceux dont la maladie est stable (Alwaili 2012), ni ceux ayant une insuffisance cardiaque chronique (Oberbach 2016). Il semblerait que ce phénotype plus pro-thrombotique soit associé avec une condition plus aiguë.

Les analyses sur l'expression différentielle des protéines permettent d'identifier celles qui sont sous- ou surexprimées de façon reproductible. En particulier, les HDLs des survivants présentaient une surexpression de plusieurs protéines pro-thrombotiques, une observation très intéressante considérant l'incidence augmentée de thromboses et embolies dans cette population (4, 118). Les HDLs des survivants non sains étaient enrichies en fibrinogène comparativement aux contrôles et aux survivants sains. Les niveaux de fibrinogène ont été étudiés dans le cancer, mais seulement en considérant le sérum, et généralement au moment du diagnostic (119, 120). Même si quelques groupes ont regardé l'effet de la chimiothérapie sur ces niveaux, les informations sont limitées à moins d'un mois de traitement. Des concentrations de fibrinogène plasmatique normales ont été rapportées chez des enfants au moment du diagnostic de LLA (119-121); l'administration d'asparaginase aurait comme effet de les faire chuter, jusqu'à 75% de diminution (119, 121). Un seul groupe a réévalué les niveaux de fibrinogène sérique et a trouvé que deux semaines sans administrer d'asparaginase représentait un sevrage suffisant pour

que ceux-ci se normalisent (121). Le méthotrexate, aussi utilisé en chimiothérapie, n'a pas d'effet sur les niveaux de fibrinogène dans la LLA pédiatrique (122). Pour l'instant, les mécanismes responsables d'un enrichissement en fibrinogène des HDLs de survivants de la LLA ne sont pas clairs. Il est possible que les niveaux élevés de fibrinogène circulant rapportés dans les populations de survivants de cancers (98, 123) entraînent un taux de liaison aux HDLs supérieur à la normale. Il est important de noter que les études sur la protéomique des HDLs en condition pathologique rapportent des résultats discordants quant à la présence du fibrinogène: certaines études n'en trouvent pas du tout (60), d'autres en trouvent en quantité similaire entre les sujets sains et les sujets pathologiques (57, 77, 116), ou trouvent une diminution du fibrinogène dans la maladie (115), et finalement certaines trouvent des HDLs enrichies en fibrinogène, que cet enrichissement soit statistiquement significatif (73) ou non (43, 87). Puisque le protéome des HDLs n'a jamais été étudié dans le cancer, il n'est pas possible de savoir si ce que nous avons observé est exclusif aux survivants de la LLA, unique aux survivants de cancers pédiatriques, ou commun parmi les survivants de cancers.

L'activité anti-thrombotique des HDLs est très rarement mesurée. Quelques techniques existent, quoiqu'elles aient été développées pour utiliser des échantillons de sang total plutôt que les lipoprotéines isolées. Dans cette étude, il ne nous a pas été possible de valider les observations réalisées en protéomique en mesurant l'activité anti-thrombotique des HDLs, dû à une quantité très limitée d'échantillons. Il est intéressant de noter que les HDLs des survivants étaient plus petites que celles des contrôles, une situation qui prédisposerait aux thromboses, comme c'est le cas dans les maladies coronariennes (124).

### **Déséquilibre anti-/pro-inflammatoire dans les HDLs des survivants**

Chez les individus en santé, les HDLs ont un effet anti-inflammatoire parce qu'elles réduisent l'expression par les cellules endothéliales de plusieurs protéines qui favorisent l'adhésion à ces cellules, dont *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *E-selectin* et *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (59, 60). Ces protéines sont responsables du recrutement et de la transmigration des macrophages dans l'intima, où ils internaliseront les LDLs oxydées, deviendront des cellules spumeuses et

initieront le processus athérosclérotique. L'Apo A-I et les espèces phospholipidiques des HDLs seraient les acteurs principaux de cette fonction (41, 125).

L'inflammation systémique est fréquente dans les conditions cardiovasculaires sévères, et est associée avec une augmentation des niveaux circulants d'amyloïde sérique A (SAA) pouvant atteindre 1000 fois les niveaux normaux (126). La SAA est une protéine pro-inflammatoire puissante, capable d'induire l'expression d'ICAM-1, de VCAM-1 et de MCP-1 (59, 126, 127). L'inflammation est connue pour entraîner un enrichissement des HDLs en SAA, tel que décrit dans les syndromes coronariens aigus (128), les infarctus du myocarde (129), les maladies coronariennes (128), les maladies rénales (59, 130) et le psoriasis (85).

L'enrichissement des HDLs en SAA les rend dysfonctionnelles, particulièrement pro-inflammatoires (59, 60, 128), mais aussi en diminuant leur capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol (130) et la production de NO (57), en partie parce que la SAA déloge l'Apo A-I des HDLs (85, 126). Bien que la radiothérapie entraîne une hausse temporaire des niveaux sériques de SAA et CRP (131), les effets du cancer et de ses traitements sur la SAA ne sont pas bien compris. Il semblerait que les niveaux de SAA augmenteraient dans les cancers actifs non traités, pour atteindre un sommet dans les maladies métastatiques ou avancées (132). Par contre, il n'a pas été étudié si la chimiothérapie ou d'autres traitements permettraient de normaliser ces niveaux.

Dans notre étude, les survivants de la LLA présentaient un profil inflammatoire, démontré par des niveaux plus élevés de CRP ( $2,5 \pm 0,7$  vs  $1,1 \pm 0,5$  mg/ml (survivants sains),  $p= 0,0269$ ) et de MDA ( $678 \pm 96$  vs  $298 \pm 49$  pmol/ml,  $p=0,0115$ ) comparativement aux contrôles. De pair avec la littérature, les HDLs des survivants non sains étaient aussi significativement enrichies en SAA comparativement aux sujets contrôles. Par contre, le contenu en Apo A-I n'en était pas affecté. Cette combinaison d'observations suggère que les HDLs des survivants de cancers pédiatriques, sans être pro-inflammatoire, sont moins fortement anti-inflammatoires. Plus d'études sont nécessaires afin d'investiguer la fonctionnalité des HDLs de survivants de cancers, qui sont enrichies en SAA.

Pour répondre au 3<sup>e</sup> sous-objectif de ce travail, qui visait à évaluer la fonctionnalité des HDLs de survivants de la LLA, 3 protocoles ont été développés et appliqués. Les capacités

antioxydantes et de promotion de l'efflux de cholestérol ont ainsi été testées. Étonnamment, les HDLs totales des survivants non sains ont réalisé un meilleur efflux que les HDLs des contrôles, alors qu'au niveau des HDL<sub>3</sub> ils avaient tendance (non significative) à être moins performants que ceux des survivants sains. Au niveau de la fonction antioxydante, très peu de HDLs (4/24) étaient réellement pro-oxydantes, et la moitié de ceux qui l'étaient provenaient de sujets sains n'ayant jamais eu de cancer. Cette étude est la première à s'intéresser à la fonctionnalité des HDLs de patients survivants du cancer.

La mesure de la fonctionnalité des HDLs est de plus en plus reconnue comme un meilleur indicateur de la santé cardiovasculaire que la simple mesure des niveaux de HDL-C. En effet, de nombreux travaux mettent en évidence des dysfonctionnements du HDL en condition pathologique, avec ou sans diminution des HDL-C (73-77). Il reste beaucoup de travail à faire afin d'élucider les causes et conséquences de ces observations. Il n'en demeure pas moins que les HDLs sont primordiaux au maintien de l'homéostasie, entre autres par leurs actions anti-inflammatoires, anti-hypertensives, anti-thrombotiques, anti-athérosclérotiques et antioxydantes, et que des HDLs qui ne remplissent pas bien leurs fonctions pourraient augmenter le risque de désordres métaboliques.

### **Capacité à promouvoir l'efflux de cholestérol**

La première fonction que nous avons testée est la capacité des HDLs à promouvoir l'efflux de cholestérol. Pour cela, nous avons utilisé 2 modèles différents, soit les cellules périphériques et les cellules macrophagiques. La plupart des groupes qui travaillent sur le sujet se contentent d'utiliser les macrophages, mais cela ne donne pas une vision globale, car le cholestérol provenant des macrophages ne représente qu'une toute petite partie du HDL-C.

L'efflux de cholestérol est initié par la liaison des HDLs à un transporteur situé sur la membrane cellulaire, tels ABCA1, ABCG1 et SR-B1. Le cholestérol libre ainsi transféré à la surface des HDLs sera estérifié par la LCAT, et se dirigera vers le centre de la lipoprotéine, qui est très hydrophobe. L'Apo A-I est primordiale pour l'accomplissement de ce processus, que ce soit en liant directement ABCA1 ou en activant la LCAT. En récupérant ce cholestérol, les HDLs diminuent les risques de lipotoxicité, et retardent le développement de la plaque athéromateuse. Les sujets ayant un efflux de cholestérol diminué par une condition génétique,

par exemple la maladie de Tangier dans laquelle les transporteurs ABCA1 sont pratiquement déficients, ont des HDL-C extrêmement bas (133). Étant donné que les survivants de cancers pédiatriques présentent un risque 8 fois plus élevé de MCV (4), il est impératif d'évaluer la capacité anti-athérosclérotique de leurs HDLs.

Les résultats d'efflux de cholestérol médié par les HDLs et les HDL<sub>3</sub> ne sont pas concluants. Nous avons observé une augmentation significative de l'efflux médié par les HDLs totales chez les survivants non sains dans le modèle de cellules périphériques, alors que parmi les mêmes échantillons, dans le modèle de cellules périphériques, 50% ont un efflux inférieur à leur contrôle. Au niveau des HDL<sub>3</sub>, aucune différence n'a été observée, bien qu'une tendance à la baisse soit perceptible chez les survivants non sains dans le modèle de cellules périphériques.

Ces résultats sont inattendus, car la littérature rapporte plusieurs occasions où un HDL-C diminué était associé à une capacité réduite à promouvoir l'efflux de cholestérol (85, 134). Un trouble de la maturation des HDLs, avec une diminution de la quantité de HDL<sub>2</sub> riches en lipides est aussi fréquemment décrit. Par contre, l'analyse du protéome des HDLs n'a pas révélé de déficiences en LCAT ou en Apo A-I, qui résulteraient en un efflux moindre. D'ailleurs, aucune des protéines impliquées dans le transport et le métabolisme des lipides n'avait une expression différentielle entre les groupes. Les conditions dans lesquelles se sont déroulées nos expériences pourraient aussi avoir influencé les résultats de façon imprévue. En effet, nous avons fait sur-exprimer les transporteurs membranaires cellulaires, alors qu'une plus faible quantité de ceux-ci pourrait aussi expliquer un HDL-C diminué. Cette hypothèse ne peut pas être investiguée car une biopsie ne faisait pas partie des procédures réalisées dans le cadre du projet de recherche (PÉTALE). De plus, en isolant les lipoprotéines, nous avons éliminé tous les facteurs plasmatiques endogènes qui pourraient modifier les HDLs, altérer son métabolisme ou interférer avec sa fonctionnalité. Il est probable que nous aurions obtenu des résultats différents si nous avions travaillé avec du sérum dont les lipoprotéines contenant de l'Apo B auraient été éliminées par précipitation, une technique utilisée par plusieurs groupes. Finalement, le petit nombre d'échantillons avec lesquels nous avons travaillé a probablement trop réduit le pouvoir statistique de nos investigations, ce qui nous empêche de prouver des différences, particulièrement dans le cas des HDL<sub>3</sub> où nous avons seulement 5 paires de sujets.

## Capacité antioxydante

La deuxième et dernière fonction que nous avons testée vise la capacité des HDLs à agir comme un antioxydant, que ce soit en protégeant contre l'oxydation, ou en inactivant les lipides oxydés. Plusieurs protéines participent à cette action, dont PON1, PON3, PAF-AH, LCAT et l'Apo A-I. L'inactivation des lipides nécessite le transfert des peroxydes lipidiques aux HDLs, où ils sont ensuite réduits en hydroxyde lipidique, leur forme inactive. La capacité antioxydante des HDLs dépend de l'efficacité du transfert des lipides vers ces lipoprotéines, qui elle-même dépend de la fluidité membranaire des HDLs, déterminée par la composition lipidique.

Une capacité antioxydante diminuée en condition pathologique a déjà été décrite dans certaines situations (73-75). Les conséquences d'une telle dysfonction sont nombreuses : le NO, un gaz vasodilatateur sécrété par les cellules endothéliales, est sensible à l'oxydation par les espèces réactives de l'oxygène et perd son action bénéfique s'il n'est pas protégé par les HDLs. Les LDLs oxydées, si elles ne sont pas inactivées par les HDLs, causent de l'inflammation dans l'intima et peuvent accélérer le développement des maladies cardiovasculaires.

Nos résultats indiquent que les HDLs des survivants de cancers pédiatriques ne sont pas plus pro-oxydantes que celles des contrôles. Effectivement, seulement 16% des échantillons présentaient un index antioxydant supérieur à 1, c'est-à-dire qu'ils étaient pro-oxydants. Étonnamment, la moitié de ces échantillons provenaient de sujets contrôles. Cela indique probablement un problème avec le protocole utilisé, ou avec les manipulations. En effet, les HDLs des contrôles auraient dû obtenir les plus petits résultats. Étant donné que le protocole a été adapté dans ce laboratoire, avec quelques difficultés, des mesures supplémentaires de la fonctionnalité antioxydante des HDLs seraient nécessaires afin de se prononcer sur la présence ou l'absence d'altération à cette fonction chez les survivants de cancers pédiatriques. La molécule fluorescente DCFH-DA que nous avons utilisée, bien que très répandue et régulièrement utilisée dans ce genre de recherche, pourrait être en partie en cause. En effet, le signal émis par celle-ci peut être amplifié de façon non désirée par l'interaction de DCF<sup>-</sup> avec O<sub>2</sub>, ce qui mène à la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui réagit avec DCFH (135). Par contre, il est vrai qu'aucune protéine participant à l'action antioxydante des HDLs n'a été trouvée avec une expression modifiée lors de l'analyse en spectrométrie de masse. Il serait néanmoins surprenant, considérant les paramètres d'inflammation (MDA et CRP) retrouvés chez les survivants, que

leurs HDLs soient réellement antioxydantes. À l'évidence, afin de tirer des conclusions valides sur la capacité antioxydante des HDLs, une plus grande variété de tests aux résultats concordants est nécessaire.

Ce travail comporte quelques faiblesses, incluant l'absence d'investigations sur la composition lipidique (particulièrement les espèces de phospholipides), l'absence de validation fonctionnelle des fonctions anti-thrombotiques et anti-inflammatoires, ainsi que le petit nombre d'échantillons (et l'absence de groupe contrôle) pour tout ce qui a trait aux HDL<sub>3</sub>. Même pour les études portant sur les HDLs totales, il est très probable que nous n'ayons pas analysé assez d'échantillons pour avoir la puissance statistique nécessaire à prouver qu'il y a une différence entre les HDLs des divers groupes. Étant donné la charge énorme de travail que représente la mise au point d'un protocole, les validations fonctionnelles des fonctions anti-thrombotiques et anti-inflammatoires n'ont pas pu être largement abordées. Les tests réalisés ici nécessiteraient aussi une validation. Nous n'avons pas non plus pu étudier les HDLs des patients au moment de leur diagnostic, puisque ceux-ci étaient recrutés seulement s'ils étaient en rémission depuis plus de 5 ans. De plus, les HDLs ne sont pas isolées au moment du diagnostic de cancer, donc de tels échantillons n'existent pas pour notre cohorte. Finalement, le lien entre les habitudes alimentaires et la composition ainsi que la fonctionnalité des HDLs n'a pas non plus pu être abordé, puisque les informations concernant les apports alimentaires des participants n'étaient pas encore disponibles.

## Chapitre 6 : Conclusion

En conclusion, la caractérisation des HDLs de survivants de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique a permis de déceler des anomalies au niveau de la composition et du contenu protéique de ces particules. La validation fonctionnelle n'a pas révélé d'atteinte aux fonctions testées (promotion de l'efflux de cholestérol et antioxydante), mais plusieurs fonctions très importantes et potentiellement affectées comme les potentiels anti-thrombotique, anti-inflammatoire, anti-apoptotique et vasodilatateur n'ont pas pu être testées.

Les observations rapportées dans ce travail indiquent que le métabolisme des HDLs chez les survivants de LLA pédiatrique est altéré, et que ces HDLs sont potentiellement moins efficaces pour maintenir la santé cardiométabolique. Plus d'études sont nécessaires afin de valider ces observations, et tester les fonctions anti-thrombotique, anti-inflammatoire et anti-hypertensive. Finalement, les habitudes alimentaires des survivants pourraient aussi influencer la composition et la fonctionnalité des HDLs, et devraient être étudiées dans cette optique.

Il est présentement impossible de se prononcer à savoir si c'est la maladie ou les traitements qui sont responsables des altérations aux HDLs. En effet, il est non éthique de ne pas traiter des enfants atteints de la leucémie, ou d'administrer de la chimiothérapie à des enfants sains simplement pour étudier leurs lipoprotéines. Par contre, l'utilisation de modèles animaux humanisés pourrait peut-être offrir quelques pistes de réponse à ce niveau. Augmenter le nombre de participants dans chacun des groupes de notre étude pourrait aussi permettre de mettre en évidence des effets différents selon les protocoles de traitement.

Les informations sur le métabolisme et la fonctionnalité des HDLs dans le cancer pourraient constituer de bons biomarqueurs pour le diagnostic, le pronostic et le traitement des patients et des survivants, dans l'optique d'améliorer leur santé et leur survie.

## Bibliographie

1. National Cancer Institute. About Cancer: What is cancer? Bethesda MD: National Institute of Health; [updated feb 9th 2015; cited 2017 jan 20th]. Available from: cancer.gov.
2. Société canadienne du cancer. Information sur le cancer 2017 [cited 2016 nov 22nd]. Available from: cancer.ca.
3. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer: Statistiques canadiennes sur le cancer 2016. Toronto (Ontario): Société canadienne du cancer; 2016.
4. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(15):1572-82.
5. Morel S, Leahy J, Fournier M, Lamarche B, Garofalo C, Grimard G, et al. Lipid and lipoprotein abnormalities in acute lymphoblastic leukemia survivors. *Journal of lipid research*. 2017.
6. Ellison L, Janz T. Incidence du cancer et mortalité par cancer chez les enfants au Canada. In: Canada S, editor.: Statistique Canada; 2015.
7. Comité directeur de la Société canadienne du cancer: Statistique canadiennes sur le cancer 2009. Toronto: Société canadienne du cancer, 2009.
8. Ministère de la Santé et des Services Sociaux du Québec. La lutte contre le cancer dans les régions du Québec: un premier bilan. In: Québec mdlSedSsd, editor. 2003. Publication no. 03-902-01
9. Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada: Statistique canadiennes sur le cancer 2008. Toronto, Canada, 2008.
10. de Menezes RF, Bergmann A, de Aguiar SS, Thuler LC. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol*. 2015;49(7):747-51.
11. Powers JM, Murphy G, Ralph N, O'Gorman SM, Murphy JE. Mitochondrial DNA deletion percentage in sun exposed and non sun exposed skin. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology*. 2016;165:277-82.
12. Wu WT, Lin YJ, Li CY, Tsai PJ, Yang CY, Liou SH, et al. Cancer Attributable to Asbestos Exposure in Shipbreaking Workers: A Matched-Cohort Study. *PloS one*. 2015;10(7):e0133128.
13. Park S, Kim Y, Shin HR, Lee B, Shin A, Jung KW, et al. Population-attributable causes of cancer in Korea: obesity and physical inactivity. *PloS one*. 2014;9(4):e90871.
14. Cannioto R, Etter JL, Guterman LB, Joseph JM, Gulati NR, Schmitt KL, et al. The association of lifetime physical inactivity with bladder and renal cancer risk: A hospital-based case-control analysis. *Cancer epidemiology*. 2017;49:24-9.
15. Simone JV. History of the treatment of childhood ALL: a paradigm for cancer cure. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(2):353-9.
16. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric clinics of North America*. 2008;55(1):1-20, ix.
17. Brandalise SR, Viana MB, Pinheiro VR, Mendonca N, Lopes LF, Pereira WV, et al. Shorter Maintenance Therapy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The

- Experience of the Prospective, Randomized Brazilian GBTLI ALL-93 Protocol. *Frontiers in pediatrics*. 2016;4:110.
18. Lipshultz SE, Adams MJ, Colan SD, Constine LS, Herman EH, Hsu DT, et al. Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: pathophysiology, course, monitoring, management, prevention, and research directions: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2013;128(17):1927-95.
  19. Cancer Care Ontario. Drug Formulary Toronto2017 [updated Mar 14 2017; cited 2016 nov 24th]. Available from: <https://www.cancercare.on.ca/toolbox/drugformulary>.
  20. Langer T, Martus P, Ottensmeier H, Hertzberg H, Beck JD, Meier W. CNS late-effects after ALL therapy in childhood. Part III: neuropsychological performance in long-term survivors of childhood ALL: impairments of concentration, attention, and memory. *Medical and pediatric oncology*. 2002;38(5):320-8.
  21. Smibert E, Anderson V, Godber T, Ekert H. Risk factors for intellectual and educational sequelae of cranial irradiation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of cancer*. 1996;73(6):825-30.
  22. Thomas-Teinturier C, Salenave S. [Endocrine sequelae after treatment of pediatric cancer: From childhood to adulthood]. *Bull Cancer*. 2015;102(7-8):612-21.
  23. Leger CS, Nevill TJ. Hematopoietic stem cell transplantation: a primer for the primary care physician. *CMAJ*. 2004;170(10):1569-77.
  24. Hashmi SK. Basics of Hematopoietic Cell Transplantation for Primary Care Physicians and Internists. *Prim Care*. 2016;43(4):693-701.
  25. Hudson MM, Ness KK, Gurney JG, Mulrooney DA, Chemaitilly W, Krull KR, et al. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *Jama*. 2013;309(22):2371-81.
  26. Children's Oncology Group. Long-term follow-up guidelines for survivors of childhood, adolescent and young adult cancers, version 4.0. Monrovia: Children's Oncology Group; 2013. Available from: [www.survivorshipguidelines.org](http://www.survivorshipguidelines.org).
  27. Armstrong GT, Liu W, Leisenring W, Yasui Y, Hammond S, Bhatia S, et al. Occurrence of multiple subsequent neoplasms in long-term survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(22):3056-64.
  28. Gunn HM, Emilsson H, Gabriel M, Maguire AM, Steinbeck KS. Metabolic Health in Childhood Cancer Survivors: A Longitudinal Study in a Long-Term Follow-Up Clinic. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 2016;5(1):24-30.
  29. de Haas EC, Oosting SF, Lefrandt JD, Wolffenbuttel BH, Sleijfer DT, Gietema JA. The metabolic syndrome in cancer survivors. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):193-203.
  30. Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama*. 2001;285(19):2486-97.
  31. Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *The Journal of nutrition*. 1998;128(2 Suppl):439S-43S.
  32. Gofman JW, Glazier F, Tamplin A, Strisower B, De Lalla O. Lipoproteins, coronary heart disease, and atherosclerosis. *Physiol Rev*. 1954;34(3):589-607.

33. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med.* 1977;62(5):707-14.
34. Camont L, Lhomme M, Rached F, Le Goff W, Negre-Salvayre A, Salvayre R, et al. Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2013;33(12):2715-23.
35. Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular research.* 2014;103(3):350-61.
36. Arora S, Patra SK, Saini R. HDL-A molecule with a multi-faceted role in coronary artery disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2016;452:66-81.
37. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL liposome. *Journal of lipid research.* 2013;54(11):2950-63.
38. Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. In: von Eckardstein A, Kardassis D, editors. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation*: Springer International Publishing; 2015. p. 3-51.
39. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of lipid research.* 2009;50(3):574-85.
40. Zhang QH, Zu XY, Cao RX, Liu JH, Mo ZC, Zeng Y, et al. An involvement of SR-B1 mediated PI3K-Akt-eNOS signaling in HDL-induced cyclooxygenase 2 expression and prostacyclin production in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2012;420(1):17-23.
41. Tolle M, Pawlak A, Schuchardt M, Kawamura A, Tietge UJ, Lorkowski S, et al. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2008;28(8):1542-8.
42. Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, et al. Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *The Journal of biological chemistry.* 2001;276(37):34480-5.
43. Alwaili K, Bailey D, Awan Z, Bailey SD, Ruel I, Hafiane A, et al. The HDL proteome in acute coronary syndromes shifts to an inflammatory profile. *Biochimica et biophysica acta.* 2012;1821(3):405-15.
44. Shah AS, Tan L, Long JL, Davidson WS. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond. *Journal of lipid research.* 2013;54(10):2575-85.
45. Wang CS, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. *The Journal of clinical investigation.* 1985;75(2):384-90.

46. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England journal of medicine*. 2007;357(21):2109-22.
47. 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. *The New England journal of medicine*. 2012;367(22):2089-99.
48. Favari E, Chroni A, Tietge UJF, Zanotti I, Escolà-Gil JC, Bernini F. Cholesterol Efflux and Reverse Cholesterol Transport. In: von Eckardstein A, Kardassis D, editors. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 181-206.
49. Zannis VI, Fotakis P, Koukos G, Kardassis D, Ehnholm C, Jauhiainen M, et al. HDL Biogenesis, Remodeling, and Catabolism. In: von Eckardstein A, Kardassis D, editors. *High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 53-111.
50. Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Current opinion in lipidology*. 2000;11(2):123-31.
51. Remaley AT, Norata GD, Catapano AL. Novel concepts in HDL pharmacology. *Cardiovascular research*. 2014;103(3):423-8.
52. Shroff R, Speer T, Colin S, Charakida M, Zewinger S, Staels B, et al. HDL in children with CKD promotes endothelial dysfunction and an abnormal vascular phenotype. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(11):2658-68.
53. Besler C, Luscher TF, Landmesser U. Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*. 2012;4(4):251-68.
54. Terasaka N, Westerterp M, Koetsveld J, Fernandez-Hernando C, Yvan-Charvet L, Wang N, et al. ATP-binding cassette transporter G1 and high-density lipoprotein promote endothelial NO synthesis through a decrease in the interaction of caveolin-1 and endothelial NO synthase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30(11):2219-25.
55. Marsche G, Saemann MD, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacology & therapeutics*. 2013;137(3):341-51.
56. Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;272(3):872-6.
57. Riwanto M, Rohrer L, Roschitzki B, Besler C, Mocharla P, Mueller M, et al. Altered activation of endothelial anti- and proapoptotic pathways by high-density lipoprotein from patients with coronary artery disease: role of high-density lipoprotein-proteome remodeling. *Circulation*. 2013;127(8):891-904.
58. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 2014;103(3):341-9.
59. Tolle M, Huang T, Schuchardt M, Jankowski V, Prufer N, Jankowski J, et al. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory capacity by accumulation of pro-inflammatory-serum amyloid A. *Cardiovascular research*. 2012;94(1):154-62.

60. Weichhart T, Kopecky C, Kubicek M, Haidinger M, Doller D, Katholnig K, et al. Serum amyloid A in uremic HDL promotes inflammation. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(5):934-47.
61. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *Journal of lipid research*. 2000;41(8):1261-7.
62. Gaudreault N, Kumar N, Posada JM, Stephens KB, Reyes de Mochel NS, Eberle D, et al. ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32(2):264-72.
63. Kotosai M, Shimada S, Kanda M, Matsuda N, Sekido K, Shimizu Y, et al. Plasma HDL reduces nonesterified fatty acid hydroperoxides originating from oxidized LDL: a mechanism for its antioxidant ability. *Lipids*. 2013;48(6):569-78.
64. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Current opinion in lipidology*. 2010;21(4):312-8.
65. Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *Journal of lipid research*. 2000;41(9):1495-508.
66. Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of lipid research*. 2000;41(9):1481-94.
67. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, Fonarow GC, Cardinez CJ, Castellani LW, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *The Journal of clinical investigation*. 1997;99(8):2005-19.
68. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circulation research*. 2006;98(11):1352-64.
69. Zabczyk M, Hondo L, Krzek M, Undas A. High-density cholesterol and apolipoprotein AI as modifiers of plasma fibrin clot properties in apparently healthy individuals. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2013;24(1):50-4.
70. Vaziri ND. HDL abnormalities in nephrotic syndrome and chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(1):37-47.
71. Shao B, Bergt C, Fu X, Green P, Voss JC, Oda MN, et al. Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(7):5983-93.
72. Chroni A, Liu T, Gorshkova I, Kan HY, Uehara Y, Von Eckardstein A, et al. The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(9):6719-30.
73. Tan Y, Liu TR, Hu SW, Tian D, Li C, Zhong JK, et al. Acute coronary syndrome remodels the protein cargo and functions of high-density lipoprotein subfractions. *PLoS one*. 2014;9(4):e94264.

74. Awad F, Contreras-Duarte S, Molina P, Quinones V, Serrano V, Abbott E, et al. [Antioxidant Dysfunctionality of High-Density Lipoproteins (Hdl) in Decompensated Diabetic Patients]. *Nutr Hosp.* 2015;32(3):1131-8.
75. Marsillach J, Becker JO, Vaisar T, Hahn BH, Brunzell JD, Furlong CE, et al. Paraoxonase-3 is depleted from the high-density lipoproteins of autoimmune disease patients with subclinical atherosclerosis. *J Proteome Res.* 2015;14(5):2046-54.
76. Cohen E, Aviram M, Khatib S, Volkova N, Vaya J. Human carotid atherosclerotic plaque protein(s) change HDL protein(s) composition and impair HDL anti-oxidant activity. *Biofactors.* 2016;42(1):115-28.
77. Manjunatha S, Distelmaier K, Dasari S, Carter RE, Kudva YC, Nair KS. Functional and proteomic alterations of plasma high density lipoproteins in type 1 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2016;65(9):1421-31.
78. Morgantini C, Natali A, Boldrini B, Imaizumi S, Navab M, Fogelman AM, et al. Anti-inflammatory and antioxidant properties of HDLs are impaired in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2011;60(10):2617-23.
79. He L, Qin S, Dang L, Song G, Yao S, Yang N, et al. Psoriasis decreases the anti-oxidation and anti-inflammation properties of high-density lipoprotein. *Biochimica et biophysica acta.* 2014;1841(12):1709-15.
80. Watanabe J, Charles-Schoeman C, Miao Y, Elashoff D, Lee YY, Katselis G, et al. Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1828-37.
81. Smith CK, Seto NL, Vivekanandan-Giri A, Yuan W, Playford MP, Manna Z, et al. Lupus high-density lipoprotein induces proinflammatory responses in macrophages by binding lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor 1 and failing to promote activating transcription factor 3 activity. *Ann Rheum Dis.* 2016.
82. Adams V, Besler C, Fischer T, Riwanto M, Noack F, Hollriegel R, et al. Exercise training in patients with chronic heart failure promotes restoration of high-density lipoprotein functional properties. *Circulation research.* 2013;113(12):1345-55.
83. Matsuo Y, Oberbach A, Till H, Inge TH, Wabitsch M, Moss A, et al. Impaired HDL function in obese adolescents: impact of lifestyle intervention and bariatric surgery. *Obesity (Silver Spring).* 2013;21(12):E687-95.
84. Nobecourt E, Davies MJ, Brown BE, Curtiss LK, Bonnet DJ, Charlton F, et al. The impact of glycation on apolipoprotein A-I structure and its ability to activate lecithin:cholesterol acyltransferase. *Diabetologia.* 2007;50(3):643-53.
85. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, et al. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *Journal of lipid research.* 2012;53(8):1618-24.
86. Siegel MO, Borkowska AG, Dubrovsky L, Roth M, Welti R, Roberts AD, et al. HIV infection induces structural and functional changes in high density lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2015;243(1):19-29.
87. Shao B, de Boer I, Tang C, Mayer PS, Zelnick L, Afkarian M, et al. A Cluster of Proteins Implicated in Kidney Disease Is Increased in High-Density Lipoprotein Isolated from Hemodialysis Subjects. *J Proteome Res.* 2015;14(7):2792-806.
88. Anchisi C, Batetta B, Sanna F, Fadda AM, Maccioni AM, Dessi S. HDL subfractions as altered in cancer patients. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;13(1):65-71.

89. Huang X, He D, Ming J, He Y, Zhou C, Ren H, et al. High-density lipoprotein of patients with breast cancer complicated with type 2 diabetes mellitus promotes cancer cells adhesion to vascular endothelium via ICAM-1 and VCAM-1 upregulation. *Breast cancer research and treatment*. 2016;155(3):441-55.
90. Alacacioglu A, Kebapcilar L, Onder Pamuk B, Sop G, Kucukiravul C, Bozkaya G, et al. Oxidative and antioxidative status after anthracyclinebased chemotherapy in breast cancer patients. *J BUON*. 2013;18(3):614-8.
91. Dogantekin A, Gurel A, Ustundag B, Ilhan S, Elkiran ET. Oxidative stress and antioxidant parameters in neutropenic patients secondary to chemotherapy. *Pak J Med Sci*. 2016;32(2):309-13.
92. Faridvand Y, Oskuyi AE, Khadem-Ansari MH. Serum 8-isoprostane levels and paraoxonase 1 activity in patients with stage I multiple myeloma. *Redox report : communications in free radical research*. 2016;21(5):204-8.
93. Dieli-Conwright CM, Wong L, Waliany S, Bernstein L, Salehian B, Mortimer JE. An observational study to examine changes in metabolic syndrome components in patients with breast cancer receiving neoadjuvant or adjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2016;122(17):2646-53.
94. Sharma M, Tuaine J, McLaren B, Waters DL, Black K, Jones LM, et al. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. *PloS one*. 2016;11(1):e0148049.
95. Alim Z, Beydemir S. Some Anticancer Agents Act on Human Serum Paraoxonase-1 to Reduce Its Activity. *Chem Biol Drug Des*. 2016;88(2):188-96.
96. Oudin C, Auquier P, Bertrand Y, Contet A, Kanold J, Sirvent N, et al. Metabolic syndrome in adults who received hematopoietic stem cell transplantation for acute childhood leukemia: an LEA study. *Bone marrow transplantation*. 2015;50(11):1438-44.
97. Friedman DN, Hilden P, Moskowitz CS, Suzuki M, Boulad F, Kernan NA, et al. Cardiovascular Risk Factors in Survivors of Childhood Hematopoietic Cell Transplantation Treated with Total Body Irradiation: A Longitudinal Analysis. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2017;23(3):475-82.
98. Giordano P, Muggeo P, Delvecchio M, Carbonara S, Romano A, Altomare M, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors in childhood acute lymphoblastic leukemia survivors. *International journal of cardiology*. 2017;228:621-7.
99. Suc I, Brunet S, Mitchell G, Rivard GE, Levy E. Oxidative tyrosylation of high density lipoproteins impairs cholesterol efflux from mouse J774 macrophages: role of scavenger receptors, classes A and B. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 1):89-99.
100. Marcil V, Lavoie JC, Emonnot L, Seidman E, Levy E. Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. *Clinical biochemistry*. 2011;44(10-11):873-83.
101. Terpstra AH, Nicolosi RJ, Herbert PN. In vitro incorporation of radiolabeled cholesteryl esters into high and low density lipoproteins. *Journal of lipid research*. 1989;30(11):1663-71.
102. Marcil V, Delvin E, Sane AT, Tremblay A, Levy E. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovascular research*. 2006;72(3):473-82.

103. Navab M, Hama SY, Hough GP, Subbanagounder G, Reddy ST, Fogelman AM. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *Journal of lipid research*. 2001;42(8):1308-17.
104. Holzer M, Schilcher G, Curcic S, Trieb M, Ljubojevic S, Stojakovic T, et al. Dialysis Modalities and HDL Composition and Function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(9):2267-76.
105. Halton JM, Nazir DJ, McQueen MJ, Barr RD. Blood lipid profiles in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1998;83(2):379-84.
106. Kuliszkievicz-Janus M, Malecki R, Mohamed AS. Lipid changes occurring in the course of hematological cancers. *Cellular & molecular biology letters*. 2008;13(3):465-74.
107. Yavasoglu I, Sargin G, Yilmaz F, Altindag S, Akgun G, Tombak A, et al. Cholesterol Levels in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of the National Medical Association*. 2017;109(1):23-7.
108. Garcia-Sanchez C, Torres-Tamayo M, Juarez-Meavepena M, Lopez-Osorio C, Toledo-Ibelles P, Monter-Garrido M, et al. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011;412(3-4):292-8.
109. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Cardoso-Saldana G, Jorge-Galarza E, Posadas-Sanchez R, Martinez-Alvarado R, et al. Abnormal high-density lipoproteins in overweight adolescents with atherogenic dyslipidemia. *Pediatrics*. 2011;127(6):e1521-7.
110. Hermans MP, Amoussou-Guenou KD, Bouenizabila E, Sadikot SS, Ahn SA, Rousseau MF. Size, density and cholesterol load of HDL predict microangiopathy, coronary artery disease and beta-cell function in men with T2DM. *Diabetes & metabolic syndrome*. 2016.
111. Juarez-Rojas J, Medina-Urrutia A, Posadas-Sanchez R, Jorge-Galarza E, Mendoza-Perez E, Caracas-Portilla N, et al. High-density lipoproteins are abnormal in young women with uncomplicated systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(11):981-7.
112. Medina-Urrutia A, Juarez-Rojas JG, Martinez-Alvarado R, Jorge-Galarza E, Posadas-Sanchez R, Cardoso-Saldana G, et al. High-density lipoprotein subclasses distribution and composition in Mexican adolescents with low HDL cholesterol and/or high triglyceride concentrations, and its association with insulin and C-reactive protein. *Atherosclerosis*. 2008;201(2):392-7.
113. Posadas-Sanchez R, Posadas-Romero C, Ocampo-Arcos WA, Villarreal-Molina MT, Vargas-Alarcon G, Antunez-Arguelles E, et al. Premature and severe cardiovascular disease in a Mexican male with markedly low high-density-lipoprotein-cholesterol levels and a mutation in the lecithin:cholesterol acyltransferase gene: a family study. *International journal of molecular medicine*. 2014;33(6):1570-6.
114. Bekhet OH, Zeljkovic A, Vekic J, Paripovic D, Janac J, Joksic J, et al. Hypertension, lipoprotein subclasses and lipid transfer proteins in obese children and adolescents. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2016;76(6):472-8.
115. Mange A, Goux A, Badiou S, Patrier L, Canaud B, Maudelonde T, et al. HDL proteome in hemodialysis patients: a quantitative nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach. *PloS one*. 2012;7(3):e34107.

116. Oberbach A, Adams V, Schlichting N, Heinrich M, Kullnick Y, Lehmann S, et al. Proteome profiles of HDL particles of patients with chronic heart failure are associated with immune response and also include bacteria proteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2016;453:114-22.
117. Yan LR, Wang DX, Liu H, Zhang XX, Zhao H, Hua L, et al. A pro-atherogenic HDL profile in coronary heart disease patients: an iTRAQ labelling-based proteomic approach. *PloS one*. 2014;9(5):e98368.
118. Sibai H, Seki JT, Wang TQ, Sakurai N, Atenafu EG, Yee KW, et al. Venous thromboembolism prevention during asparaginase-based therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Current oncology*. 2016;23(4):e355-61.
119. Albayrak M, Gursel T, Kaya Z, Kocak U. Alterations in procoagulant, anticoagulant, and fibrinolytic systems before and after start of induction chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2013;19(6):644-51.
120. Sehgal S, Sharma S, Chandra J, Nangia A. Coagulation Profile at Diagnosis in Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian journal of pediatrics*. 2016;83(10):1082-6.
121. Sehgal S, Sharma S, Chandra J, Nangia A. Coagulation profile during induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Indian journal of pathology & microbiology*. 2017;60(1):50-6.
122. Fisgin T, Yarali N, Kara A, Bozkurt C, Birgen D, Erten U, et al. Hemostatic side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric hematology and oncology*. 2004;21(1):77-83.
123. Mulrooney DA, Ness KK, Solovey A, Hebbel RP, Neaton JD, Peterson BA, et al. Pilot study of vascular health in survivors of Hodgkin lymphoma. *Pediatric blood & cancer*. 2012;59(2):285-9.
124. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18(7):1046-53.
125. Murphy AJ, Woollard KJ, Suhartoyo A, Stirzaker RA, Shaw J, Sviridov D, et al. Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31(6):1333-41.
126. Artl A, Marsche G, Lestavel S, Sattler W, Malle E. Role of serum amyloid A during metabolism of acute-phase HDL by macrophages. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20(3):763-72.
127. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, et al. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1994;180(1):203-9.
128. Zewinger S, Drechsler C, Kleber ME, Dressel A, Riffel J, Triem S, et al. Serum amyloid A: high-density lipoproteins interaction and cardiovascular risk. *European heart journal*. 2015;36(43):3007-16.
129. Rached F, Lhomme M, Camont L, Gomes F, Dauteuille C, Robillard P, et al. Defective functionality of small, dense HDL3 subpopulations in ST segment elevation myocardial

- infarction: Relevance of enrichment in lysophosphatidylcholine, phosphatidic acid and serum amyloid A. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1851(9):1254-61.
130. Holzer M, Birner-Gruenberger R, Stojakovic T, El-Gamal D, Binder V, Wadsack C, et al. Uremia alters HDL composition and function. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(9):1631-41.
  131. Widlak P, Jelonek K, Wojakowska A, Pietrowska M, Polanska J, Marczak L, et al. Serum Proteome Signature of Radiation Response: Upregulation of Inflammation-Related Factors and Downregulation of Apolipoproteins and Coagulation Factors in Cancer Patients Treated With Radiation Therapy--A Pilot Study. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;92(5):1108-15.
  132. Wang J, Ma R, Sharma A, He M, Xue J, Wu J, et al. Inflammatory serum proteins are severely altered in metastatic gastric adenocarcinoma patients from the Chinese population. *PloS one*. 2015;10(4):e0123985.
  133. Puntoni M, Sbrana F, Bigazzi F, Sampietro T. Tangier Disease. *American Journal of Cardiovascular Drugs*. 2012;12(5):303-11.
  134. Posadas-Sanchez R, Posadas-Romero C, Mendoza-Perez E, Caracas-Portilla NA, Cardoso-Saldana G, Medina-Urrutia A, et al. Cholesterol efflux and metabolic abnormalities associated with low high-density-lipoprotein-cholesterol and high triglycerides in statin-treated coronary men with low-density lipoprotein-cholesterol <70 mg/dl. *The American journal of cardiology*. 2012;109(5):636-41.
  135. Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free radical biology & Medicine*. 2012;52(1):1-6.