"Université de Bourgogne Franche-Comté – UFR des Sciences Médicales et Pharmaceutiques"

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE COMTÉ

École Doctorale Homme, Environnement, Santé

Les "Liver X Receptors" :

Modulateurs des fonctions des cellules dendritiques plasmocytoïdes et de leur contrepartie leucémique.

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2015 par

Adam CEROI

En vue du grade de

Docteur

de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Directeurs de thèse : Pr Philippe SAAS

Jury :

Pr François MULLIER (Rapporteur)

Dr Wilfried LE GOFF (Rapporteur)

Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE

Pr Philippe SAAS

Pr David MASSON

Pr Francine GARNACHE-OTTOU

REMERCIEMENTS

J'exprime ma plus sincère reconnaissance aux **Dr Wilfried LE GOFF** et **Pr François MULLIER** pour avoir accepté de rapporter mon travail de thèse et de faire partie de mon jury. Je tiens également à remercier le **Dr Nathalie BENDRISS-VERMARE, Pr Francine GARNACHE-OTTOU, Pr David MASSON** et **Pr Philippe SAAS** pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Plus particulièrement, je ne pourrais tirer ma révérence sans penser aux personnes qui m'auront accompagnées et soutenues durant ces dernières années. Ce travail n'est que le produit de toutes ces bonnes intentions, je n'en ai été que le catalyseur.

Au Pr Philippe SAAS, directeur de l'UMR1098 et directeur de thèse. Merci de m'avoir donné ma chance et fait confiance. Malgré cette double charge qui vous incombe, nous avons trouvé le rythme et équilibre nécessaires au développement de ce travail de thèse. Merci pour vos conseils, la liberté de recherche que vous m'avez accordé, ainsi que les expériences d'encadrement de stagiaires qui m'ont permis de m'épanouir (parfois au détriment de ces derniers, désolé et bravo aux survivants). Vous m'avez soutenu dans les moments difficiles, et surtout vous m'avez si justement rappelé que quoi qu'il advienne : « The show must go on !! ». Je sais que notre collaboration ne s'arrêtera pas en si bon chemin…

Au Pr David MASSON. Ça y est ! J'ai retenu le chemin jusqu'à Dijon, je suis passé sous la barre des 2h30 (bien que je regrette un peu mes visites de la campagne bourguignonne), promis plus de retards (moins en tout cas). Merci pour vos conseils avisés, votre disponibilité que ce soit à la paillasse comme dans la discussion. Un phare dans la nuit des LXR.

Au Pr Francine GARNCHE-OTTOU. Pour votre confiance accordée en me confiant les enseignements d'hématologie (j'espère en avoir été digne). Pour m'avoir offert l'opportunité de ma première communication orale (annoncé le mercredi pour le vendredi), me permettant de faire ma première séance intensive de biblio sur les microparticules (et de bloquer l'accès biblioinserm au passage)… challenge accepted… and completed ! Pour votre accueil dans l'équipe LPDC. Pour tout cela, un immense merci.

Au Pr Estelle SEILLES. Pour les heures d'enseignement que vous m'avez permis de réaliser. J'ai été honoré de partager votre vision de l'enseignement et de la communication scientifique. Je garde cette base fondatrice pour mes années à venir.

Au Dr Sylvain PERRUCHE. Merci pour ta contribution au dynamisme TIT et le dynamisme ATI dont tu es la figure de proue. Un immense merci pour m'avoir présenté Kodi Ravichandran, qui j'espère n'aura pas succombé qu'aux relents de mon pot de thèse de la veille. Cette immense opportunité qu'est ce post-doc, je te la dois en grande partie.

Au Dr Fanny ANGELOT-DELETTRE. Ma très chère Fanny, tu fais bien partie des chefs maintenant mais pour moi tu resteras une frangine. C'est comme ça. Merci pour ton soutien, d'avoir mis le pied dans LXR et les microparticules.

Au Pr Olivier ADOTEVI. Toi qui m'auras poussé à l'adultère scientifique en me rapprochant de la cancéro. Tu as enrichi mon champ de perception scientifique. En d'autres circonstances, a une autre époque qui sait….un jour peut-être.

Au Dr Yann GODET. Ô Capitaine mon Capitaine, ce fut un plaisir de servir à tes côtés. J'ai fait ce que j'ai pu pour apprendre du grand enseignant que tu es (a vu de nez 1m80). Tu m'auras appris à présenter, éduquer pour induire une maturation efficace, et pas juste palper mon environnement…non mais !

A mes compagnons de paillasse :

Sabeha, grâce à toi j'ai appris à ranger un labo (enfin j'ai essayé…et j'essaie encore d'ailleurs), et tant d'autres choses bien sûr. Prend soin de toi et je t'assure que tu ne travailles pas le vendredi après-midi normalement !!! A très bientôt, peut-être sur les planches, qui sait. Anne Roggy, ma très chère Anne, découvreuse de plasmocytes, dompteuse de DChip et tant d'autres choses. En vrai je peux te le dire maintenant, j'arrivai a utilisé DChip tout seul mais c'était tellement mieux quand tu me montrais. Je me demande bien qui va t'embêter maintenant. Embrasse Louise et toute la famille pour moi. Tristan Zver, alias Bobby. Nous y voilà vieux frère. Merci pour tous ces bons moments, m'avoir sorti de mon autisme scientifique et inculqué quelques règles « d'ortografe » et de savoir-vivre (tu n'as pas compris, je suis précurseur des nouvelles réformes de la langue française, promis je te donnerai des cours pas chers). Et oui on ne dit pas [miss] mais [mice], c'est « Allo, Adam CEROI à l'appareil » …. Tant d'autres choses. Embrasse ta « très charmante » sœur pour moi et surtout : Quand va-t-on atteindre le septième sky ?! (cf La compagnie du p'tit Vélo, merci Sabeha).

Laure(tte) Philippe-Walter, alias la rockeuse de diamant. Une page ne suffirait pas pour faire ton éloge et tu le sais. Je ne pensais pas trouver quelqu'un comme toi sur ma route, ça me rassure un peu. Il y a plus fêlée de la cafetière que moi… (c'est le n°12 de mon équipe de foot dans ma tête qui parle, tu commences à le connaitre). Clémence, ma chère p'tite frangine. C'est toi l'aînée de la fratrie maintenant. Tu prendras soin de notre petite sœur Cécile pour moi promis ?! C'est une gentille fille, tu verras. Thierry, ou aussi mon petit bichon frisé. Je les aiment avec moins de barbe habituellement, mais pour toi…. Je n'ai pas encore déclaré forfait et te foutrai ta raclé aux échecs…. J'ai déjà 2x0,5 victoires à mon actif. Après 6 ans de post doc, j'aurai le niveau c'est bien ce que tu disais ?.... Challenge accepted ! En parlant performance, il est où ce Nature sur la thrombospondine que tu m'as promis ?! J'en profite, Omayra, arrête avec les métalloprotéases. Ce n'est pas la peine, c'est mort, arrête… C'est comme toi sur un vélo. Je plaisante, tu es superbe, avec ou sans vélo d'ailleurs. Quand c'est qu'on va courir ? Adrien MOSSU, pardon je la refais. Au Dr MOSSU. Mon p'tit schmeterling….je l'avais dit qu'il y aurait un après Vienne. Merci pour ton aide sur le murin et ces petits sursauts que tu faisais pour me divertir quand je venais te voir. Alexandrine, la plus grande amatrice de camomille que je connaisse. Dommage que tu aies été aussi loin de nous, même si au final…

A tous les TIMC :

Jeanne Galaine, un si bel enrobage pour un actif pétillant. Non je ne dis pas que tu es enrobé…oh et puis mince. Afag, notre perle Azéris. Elodie Lauret Jésus-Marie-Joseph, Il y a une erreur dans ton nom je crois…je n'trouve po. Avec sa perruque magique. « Adam » bientôt j'espère. Cadeau ! Sindy,

copine de potins…Avec ton homme vous m'aurez fait atteindre des hauteurs. Emilie, ça y est, t'as plus peur d'être seul au cytomètre avec moi, tard le soir. Première phase terminée. A quand la deuxième… Beziaud. Kamal. Walid, Arrête ça sert à rien ce que tu fais…c'est un car-nage. Lyse. Adeline Bouard. Charline...

Et les autres (pas moins importants) :

Caro, ça n'aurait pas été pareil sans toi. Merci pour ces dernières années. Kiki, ma p'tite vieille courbaturée. Ce qui est bien avec toi, c'est que j'ai l'impression de m'occuper des personnes âgées. T'as vu comme je suis gentil quand même… ;). Laurie d'la com, ma p'tite bichette. Eléonore et Adeline, mes ex coloc, pour le meilleur comme pour le pire. Beaucoup de meilleur quand même. Geoffrey, le p'tit coq a le champ libre, fonce mon poulet avant que je te tape la fesse…et embrasse ta charmante sœur pour moi surtout. Gaëlle PBM, élément fort de la PBM. Sarah, dealeuse de caféine et poudre de thé magique. J'attends aussi les dragées roses, What else ? Anne Dup', la maitresse de la biomol. Clémentine, copine microparticules. Francis, merci pour ton aide et expertise murine. Mélanie pour le plaisir de te voir et de partager avec toi. Si tu as d'autres russes ou polonaises en stock n'hésite pas…ça sonne très bizarre quand même ! Anna, t'es unique, un vrai rayon de soleil. Patricia, mon cahier de labo est à jour, promis, ais pitié de moi… Sophie Aupet. Ex gardienne de Navios. Jean-Paul, à ce qu'il paraît vous êtes mon avenir, je ne suis pas sûr qu'une vie suffira pour atteindre le centième de votre niveau, mais j'y travaille. Mireille, Céline, Myriam, Dominique, François, Sophie L….

A mes amis (pour ceux qui n'ont pas encore été cités) :

Winninger, après toutes ces années, ces aventures et désaventures… Encore à se supporter !!… Merci. Gush…je vais veiller à la bienséance de mes propos, je me sens observé … Thomas, un grand violoniste (malgré la taille…☺), capable de masquer mes errances et de révéler…ce qu'il y a de pire en moi ! Tout est de ta faute, je te le répète. Et tous les autres…

A Coralie, bien que nos chemins se soient séparés, merci pour ton soutien et ces merveilleuses années partagées. Mon ex belle-famille, ce sera toujours un plaisir de s'arrêter pour un p'tit schnaps…ou juste pour vous voir.

A ma famille :

A mes grands-parents pour avoir engendré mes parents, pour m'avoir engendré moi. Modeste est mon deuxième nom. Surtout pour tout le reste : votre amour, votre soutien, votre rôle primordial dans la construction de ma petite personne et la réalisation de cette thèse. Je ne peux malheureusement pas m'étendre mais sachez bien que je vous dois tout, et vous serai à jamais reconnaissant.

Milles mercis à vous tous. Si j'en oublie, c'est juste parce que : « Si ma tête n'était pas attaché ça fait belle lurette que je l'aurais oublié ». Rien de personnel donc.

Je ne vous souhaite pas tous mes vœux de bonheur, ça voudrait dire qu'on ne se révéra pas, ce qui est exclu. Plutôt :A très bientôt pour de nouvelles aventures.

Bien à vous,

Adam CEROI

“Discovery is to see what everybody has seen and think what nobody has thought”

Albert Szent-Györgyi, Nobel Laureate 1937

A ma famille, mes amis

RESUMÉ

Les "*Liver X receptors"* (LXR) sont des récepteurs nucléaires impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. Dans les macrophages, la stimulation de la voie LXR accroit la clairance des corps apoptotiques et réprime la réponse inflammatoire. Les récepteurs LXR ont également été observés comme inhibant la prolifération cellulaire, et induisant la mort de cellules malignes.

Les cellules dendritiques plasmocytoïdes (PDC) contribuent à la clairance des microparticules (MP). Ces vésicules extracellulaires dérivées de la membrane des cellules, exposent à leur surface des phosphatidylsérines (PS). Une augmentation de MP endothéliales (EMP) circulantes a été observée dans plusieurs circonstances pathologiques impliquant également les PDC. Nous démontrons ici que la prise en charge des MP implique les PS exprimées à leur surface, par interaction avec le récepteur BAI1 exprimé par les PDC. Ce recepteur est induit par la stimulation des LXR. Cette interaction entraine l'internalisation des MP qui dans le cas des EMP conduira à l'activation de la voie NF-κB et la répression des LXR. L'effet opposé est induit pour des MP dérivées de plaquettes (PMP), n'entrainant pas de réponse inflammatoire. Nous avons confirmé que ces deux voies de signalisation (NF-κB et LXR) engagées par les MP pouvaient se réprimer mutuellement, déterminant la réponse inflammatoire des PDC induite par la prise en charge des MP.

La contrepartie leucémique des PDC (LPDC) est à l'origine d'une hémopathie maligne agressive appelée néoplasie dérivée des cellules dendritiques plasmocytoïdes (BPDCN). Contrairement aux PDC primaires, et de manière spécifique par rapport à d'autres leucémies aiguës (LAM et LAL), nous avons observé une diminution de l'activation de la voie LXR et de gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol, dans les LPDC. La restauration de ces activités dans les LPDC par des agonistes LXR entrainait un effet cytotoxique et antiprolifératif. Ces traitements induisaient une répression de la voie NF-κB ainsi que l'augmentation de l'efflux du cholestérol, deux voies pouvant induire la mort des LPDC. De plus, LXR interfère avec la signalisation induite par l'IL-3 (impliquant Akt et STAT5), qui est connue pour augmenter la survie des LPDC *in vitro*. L'utilisation d'un modèle xénogénique murin de BPDCN, nous a permis de confirmer l'effet bénéfique du traitement agoniste LXR limitant la cytopénie induite par la BPDCN ainsi que les infiltrats LPDC.

Ces travaux démontrent donc que la voie LXR est fonctionelle dans les PDC et LPDC, et impliquée dans une régulation croisée avec NF-kB. Les LXR participent à la clairance des MP et induisent un effet anti-inflammatoire pour les PDC, ainsi qu'un effet anti-leucémique sur les LPDC impliquant plusieurs mécanismes.

ABSTRACT

Liver X Receptors (LXR) are nuclear receptors involved in cholesterol homeostasis. In macrophages, LXR promote apoptotic body/cell clearance and repress inflammatory responses. LXR are also shown to inhibit cell proliferation and induce malignant cell death.

We reported here that plasmacytoid dendritic cells (PDC) contribute to microparticle (MP) clearance. MP derived from cell membrane, express high levels of phosphatidylserines (PS). Increased number of circulating MP derived from endothelial cells (EMP) has been found in several pathological circumstances involving also PDC in the pathogenesis of these diseases. We demonstrate here, that MP engulfment by PDC involves PS binding to the PS receptor BAI1, expressed on PDC. This receptor is induced by LXR stimulation. During EMP engulfment, the MP-PS/BAI1-PDC interaction leads to EMP internalization, inducing NF-κB triggering and LXR downregulation. The opposite effect is observed with platelet-derived MP (PMP) which does not induce inflammatory response. Overall, we show a crosstalk involving LXR and NF-κB, which dictates the inflammatory fate of PDC engulfing MP.

The leukemic PDC counterpart (LPDC) has been identified to be responsible of an aggressive hematologic malignancy called blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN). In contrast to healthy PDC and other acute leukemias (including lymphoid and myeloid acute leukemias), we report here a specific downregulation of LXR target and cholesterol efflux-associated genes in BPDCN cells. LXR pathway restoration in LPDC by LXR agonist treatment inhibits cell proliferation and survival. This treatment induces NF-κB signaling pathway inhibition (observed in LPDC) and an increased cholesterol efflux, two pathways that may explain LPDC cell death. Moreover, LXR hampers the IL-3-induced signaling pathway (involving Akt and STAT5), which is known to promote LPDC survival *in vitro*. Using a xenogeneic mouse model of BPDCN, we confirm the beneficial effects of LXR agonist treatment that limits BPDCN-induced cytopenia and bone marrow and spleen LPDC infiltration.

Overall, we demonstrate here that LXR are functional in PDC and LPDC and involved in a cross-regulation mechanism with NF-kB. LXR promote the MP engulfment and control inflammatory responses in PDC, as well as exert an anti-leukemic therapeutic effect in BPDCN involving several mechanisms.

TABLE DES MATIERES

Résumé 1

Abstract 6

Table des matières 7

Table des illustrations 11

Liste des tableaux 13

ABREVIATIONS 15

Introduction 19

Chapitre I. *Liver X Receptors* : un outil de modulation des fonctions cellulaires 19

I. Les Récepteurs Nucléaires : Généralités 20

1. Nomenclature 20

2. Structure 23

3. Modifications post-traductionnelles des Récepteurs Nucléaires 25

4. Expression et localisation cellulaire 25

5. Mode de liaison à l'ADN 27

6. Activité transcriptionelle 28

7. Interférence transcriptionelle 30

8. Les différentes classes de ligands 31

II. Les Liver X Receptors 33

1. Modulation de l'activité des *Liver X Receptors* par les ligands 33

2. Autres modes de régulation 36

III. Implication des *Liver X Receptors* dans le métabolisme du cholestérol. 38

1. Entrée du cholestérol dans la cellule 38

2. Biosynthèse du cholestérol 39

3. Efflux du cholestérol cellulaire 41

4. Les *Liver X Receptors* diminuent l'accumulation de cholestérol intracellulaire 42

IV. Modulation de l'immunité innée par les *Liver X Receptors* 44

1. Internalisation 44
2. Inflammation et facteurs de transcription 45
V. Les *Liver X Receptors* dans les hémopathies malignes (et autres cancers) 48
1. Les *Liver X Receptors* et mort cellulaire 49
2. Régulation du cycle cellulaire par les *Liver X Receptors* 50
3. *Liver X Receptors* dans les cellules somatiques : régulation indirecte de la croissance tumorale 50
VI. Utilisation clinique des agonistes *Liver X Receptors* : espoirs et limitations 52
1. *Les* agonistes des *Liver X Receptors* dans les études cliniques 54
Chapitre II. Les Cellules Dendritiques Plasmocytoïdes Humaines 56
VII. Généralités 56
1. Bref Historique 56
2. Sous-populations de cellules dendritiques 57
VIII. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes humaines 63
1. Migration et localisation 63
2. Capture de l'antigène et activation 65
3. Profil de maturation des cellules dendritiques plasmocytoïdes 72
4. Induction d'une réponse spécifique 76
5. Cellules dendritiques plasmocytoïdes et pathologies inflammatoires chroniques 78
IX. La contrepartie leucémique des cellules dendritiques plasmocytoïdes : La néoplasie à cellules dendritiques plasmocytoïdes ou BPDCN 83
1. Identification et caractérisation 83
2. Incidence Clinique 84
3. Approches thérapeutiques 86
Chapitre III. Les Microparticules 88
I. Généralités 88
1. Historique 88
2. Caractérisation et nomenclature 89

3. Formation des microparticules 90
4. Clairance des microparticules 92
II. Composition des microparticules 93
1. Les composés membranaires 93
2. Protéines intra-particulaires 94
3. Acides nucléiques 95
4. Composés lipidiques 96
III. Microparticules et pathologies inflammatoires 98
1. Athérosclérose 100
2. Autres maladies inflammatoires : Les maladies auto-immunes 103
IV. Conditions d'utilisation des microparticules pour leur caractérisation fonctionnelle 105
1. Préparation spécifique des échantillons 105
2. Analyses fonctionnelles 106
Travaux Personnels 107
Chapitre IV. Objectifs du travail de thèse 107
Chapitre V. Resultats 109
Etude 1 : Implication des LXR dans l'internalisation de microparticules par les PDC, et dans la réponse inflammatoire induite. 109
1. Article 111
2. Données complémentaires à l'étude 135
Etude 2 : Les Liver X receptor (LXR), comme nouvelle cible thérapeutique dans la leucémie à cellules dendritiques plasmacytoides (BPDCN) 136
1. Article 139
2. 2. Données complémentaires à l'étude 183
Discussion et perspectives 187
Références Bibliographiques 195

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 - Structure des récepteurs nucléaires représentés par leurs différentes régions. 23

Figure 2 - Domaine de liaison à l'ADN (DBD) et interaction avec l'élément de réponse de l'ADN. .24

Figure 3 - Les 3 classes d'éléments de réponse de l'ADN aux NR.....26

Figure 4 - Fixation des NR sur leurs éléments de réponse à l'ADN et partenaires protéiques. 27

Figure 5 - Complexes corépresseurs, coactivateurs et échange dépendant du ligand. 29

Figure 6 - Modèle de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires. 31

Figure 7 - Voies métaboliques du cholestérol et synthèse de ligands naturels des LXR. 35

Figure 8 - Schéma de régulation post-traductionnelle des SREBPs.....40

Figure 9 - Schéma illustrant le mécanisme d'efflux du cholestérol impliquant ABCA1/ABCG1. 42

Figure 10 - Les Prix Nobels de Physiologie et Médecine 2011 56

Figure 11 - Sous-types de cellules dendritiques humaines « classiques » et leurs équivalents murins.59

Figure 12 - Modèle de différenciation et distribution des DC humaines. 61

Figure 13 - Signalisation des voies TLR7/9 dans les PDC.....67

Figure 14 - Régulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs de la famille TAM dans les DC myéloïdes.....70

Figure 15 - Signalisation TLR7/9 dans les PDC murines et humaines. 74

Figure 16 - Modèle de reconnaissance des acides nucléiques du soi par les PDC et engagement de la voie TLR9.....80

Figure 17 - Implication des PDC dans l'athérosclérose. 82

Figure 18 - Cellules dendritiques plasmocytoïdes leucémiques (LPDC) retrouvées dans la BPDCN : morphologie et activation IL-3.....83

Figure 19 - Lésions cutanées et éléments pour le diagnostic. 85

Figure 20 - Schéma illustrant les différentes étapes de formation des microparticules. 91

Figure 21 - Développement de la plaque d'athérome. 101

Figure 22 - Chevauchement des propriétés physiques des vésicules biologiques.....105

Figure 23 – Les cellules CAL-1 expriment un LXR fonctionnel 135

Figure 24 - Expression des récepteurs aux phosphatidylsérines et effet de la stimulation LXR sur les PDC et CAL-1 136

Figure 25 – Les agonistes LXR activent la caspase 8.. 183

Figure 26 - Les agonistes de LXR sensibilisent les LPDC à la mort induite par TRAIL. 184

Figure 27 - L'activation de LXR simultanément à l'inhibition de NF-κB augmente l'effet cytotoxique 186

Figure 28 - Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur la voie LXR et les PDC ou les LPDC. ... 193

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Récepteurs Nucléaires Humains. 22

Tableau 2 - Modulation des LXR. 37

Tableau 3 - Traitement par agonistes LXR dans les cancers 49

Tableau 4 - Agonistes LXR couramment utilisés comme outil d'étude ou ayant fait l'objet d'une étude clinique. 55

Tableau 5 - Caractéristiques physicochimiques des vésicules extracellulaires. 90

Tableau 6 Marqueurs d'identification des origines cellulaires des MP. 93

Tableau 7 - Molécules bioactives transférées par les microparticules. 97

Tableau 8 - Pathologies pour lesquelles le nombre de MP est modifié au niveau sanguin ou dans d'autres liquides biologiques (le liquide céphalorachidien, LCR). 99

Tableau 9 - Effet des traitements des maladies cardiovasculaires sur le taux de microparticules plasmatiques. 102

ABREVIATIONS

22(R)-HC	22(R)-hydroxycholestérol
22(S)-HC	22(S)-hydroxycholestérol
7-AAD	7-aminoactinomycine D
AATF	*Apoptosis-antagonizing transcription factor*
ABCA1/G1	*ATP binding casette A1/G1*
Ac	Anticorps
ACAT	*Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*
ADCC	*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (Cytotoxicité Cellulaire dépendante des anticorps)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
Ag	Antigènes
APC	*antigen presenting cells*
ApoA/E/C	Apolipoprotéine A/E/C
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messager
AV	Annexine V
BAI1	*Brain-specific angiogenesis inhibitor 1*
Ba-P	*Basophil Progenitor*
BCL2	*B-cell lymphoma 2*
bFGF	*basic fibroblast growth factor*
BPDCN	*Blastic Plasmacytoide Dendritic Cells Neoplasm* (Néoplasies Blastiques à Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes)
CAR	*Chimeric Antigen Receptor* (Récepteur à l'Antigène Chimérique)
CD	*Cluster of Differenciation*
cDC	*conventional Dendritic cells* (Cellules dendritiques conventionelles)
CDP	*Common DC Progenitor (*Progéniteur commun des cellules dendritiques)
CHO	*Chinese Hamster Ovarian cells (*cellules ovarienne de hamster chinois)
CMH I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CORO2A	*coronin 2A*
CPA	Cellule(s) Présentatrice(s) de l'Antigène
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
DBD	*DNA Binding Domain* (Domaine de Liaison à l'ADN)
DC	*Dendritic cells* (Cellules Dendritiques)
DCML	*Dendritic Cell, Monocytes, B and NK lymphoid cells* (Cellules dendritiques, Monocytes, Lymphocytes B et NK)

DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAE	*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale)
EMP	*Endothelial cell derived Microparticles* (Microparticules Endothéliales)
Eo-P	*Eosinophil Progenitor* (Progéniteur des Eosinophiles)
EV	*Extracellular Vesicles* (Vésicules Extracellulaires)
FASN	*Fatty Acid Synthase*
FLT3	*Fms-like tyrosine kinase 3*
FLT3L	*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*
FT	Facteur de Transcription
GFP	*Green Fluorescent Protein*
GMP	*Granulocyte Macrophage Progenitor* (Progéniteur des Granulocytes et Macrophages)
GPS2	*G-protein pathway suppressor 2*
GR	*Glucocorticoid Receptor*
GVHD	*Graft Versus Host Disease* (Maladie du geffon contr l'hôte)
GW3965	*3-(3-(2-chloro-3-trifluorome- thylbenzyl-2,2-diphenylethylamino) propoxy)phenylacetic acid*
HAT	histone acetyltransférase
HDAC	histone désacetylase
HDL	*High Density Lipoprotein* (Lipoprotéines de Haute densité)
HEV	*High Endothelial Veinule* (veinules endothéliales hautes)
HMGB1	*High Mobility Group Box 1*
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA réductase
IL	Interleukine
IL-3Rα	Chaine α du récepteur à l'Interleukine-3 (CD123)
INSIG	*Insulin-induced gene protein*
IPC	*Interferon Producing Cells* (Cellules Productrices d'Interféron)
IRF	*Interferon Regulatory Factors*
ISGF	*IFN-stimulated gene factor*
JAK	*Janus Kinase*
LAL	Leucémie(s) Aiguë(s) Lymphoblastique(s)
LAM	Leucémie(s) Aiguë(s) Myéloïde(s)
LB	Lymphocytes B
LBD	*Ligand Binding Domain* (Domaine de liaison au ligand)
LBP	*Ligand Binding Pocket* (Poche de liaison au ligand)
LCAT	*lecithin/cholesterol acyltransferase*
LDL	*Low Density Lipoprotein* (Lipoprotéines de Faible densité)
LDLR	*LDL Receptor*
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LPDC	*Leukemic Plasamacytoïd Dendritic Cells* (Cellules Dendritiques Plasmocytoïdes Leucémique)
LPL	*Lipoprotein lipase*
LPS	*Lipopolysaccharide*

LRP	*Low density lipoprotein receptor-related protein*
LT	Lymphocytes T
LXR	*Liver X Receptor*
LXRE	*LXR Response Element* (Elément de réponse à LXR)
MAPK	*Mitogen-Activated Protein Kinase*
MD2	*Myeloid Differenciation Protein 2*
mDC	*myeloïd Dendritic Cells* (Cellules Dendritiques myéloïdes)
ME-P	*Megakaryocyte-erhytroid Progenitor cell* (Progéniteurs des Mégacaryocytes et érythrocytes)
miARN	Micro-ARN
MLP	*Multi-lymphoid Progenitor* (Progéniteur multi-Lymphoïdes)
MM	Myélome Multiple
moDC	*monocytes derived dendritic cells* (Cellules dendritiques dérivées de monocytes)
Mono	Monocytes
MP	Microparticules
MyD88	*Myeloid Differentiation primary-response gene 88*
Mρ	Macrophages
N-CoR	*nuclear receptors corepressor*
NET	*Neutrophil Extracellular Traps*
NF-κB	*Nuclear Factor-κB*
NK	*Natural Killers*
NPC	*Natural IFN-alpha producing cells*
NR	*Nuclear receptors* (Récepteurs nucléaires)
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cells* (cellules mononucléées du sang périphérique)
PDC	*Plasmacytoid dendritic cells* (Cellules dendritiques Plasmocytoïdes)
PDGF	*Platelet-Derived Growth Factor*
PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PKA/C	*Protein Kinase A/C*
PMP	*Platelet derived Microparticles* (Microparticules Plaquettaires)
PRR	*Pathogen recognition receptors*
PS	Phosphatidylsérines
qRT-PCR	*quantitative Reverse-Transcriptase Polymerase chain reaction* (Réverse Transcription PCR quantitative)
RAR	*Retinoic Acid Receptor*
RCT	*Revers Cholesterol Transport* (Transport inverse du cholestérol)
RE	*Response Element* (Elément de réponse)
RLR	*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*
RXR	*Retinoid X Receptor*
SCAP	*SREBP cleavage-activating protein*
SMRT	*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors*
SR-B1	*Scavenger receptor class B type I*
SRE	*SREBPs Respons Elements* (Elements de réponse aux SREBPs)
SREBP	*Sterol regulatory element-binding proteins*

STAT	*Signal Transducer and Activator of Transcription*
SUMO	*Small Ubiquitin MOdifier*
T0901317	N-(2,2,2-tri- fluoro-ethyl)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluoro- methyl-ethyl)-phenyl]-benzenesulfonamide
TA	Température Ambiante
TAM	Tyro3, Axl, Mertk
TBLR1	*transducin β1-related protein 1*
TG	Tryglycérides
TIM	*T-cell immunoglobulin and mucin domain 1*
TLR	*Toll Like Receptors*
TNF-α	*Tumor Necrosis Factor α* (Facteur de nécrose tumorale alpha)
TRAIL	*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*
TYK	Tyrosine Kinase
VEGF	*Vascular Endothelial Growth Factor*
VLDL	*Very Low Density Lipoprotein*
VLDLR	*VLDL Receptor* (Récepteurs aux VLDL)

INTRODUCTION

Chapitre I. *Liver X Receptors* : un outil de modulation des fonctions cellulaires

Le contrôle de l'expression génique est déterminant dans la régulation des processus physiologiques et pathologiques. Les hormones lipophiles et leurs substituts de synthèse possédant la capacité de diffuser à travers les membranes cellulaires ont un rôle important dans ce processus. Parmi ces dernières, les stéroïdes, les rétinoïdes (métabolites de la vitamine A), les hormones thyroïdiennes et la vitamine D sont de puissants régulateurs du développement, de la différenciation et des fonctions des cellules de l'organisme (1–3). Ces molécules exercent leur action par liaison à leurs récepteurs intracellulaires respectifs, qui a leurs tours, interagissent avec d'autres facteurs de transcription, ou agissent directement sur la transcription des gènes cibles. Leurs récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (NR). L'intérêt thérapeutique de leur modulation est déjà exploité à travers l'utilisation d'agonistes du récepteur aux acides rétinoïques α (RARα, aussi nommé NR1B1) dans le traitement de leucémies promyélocytaires (4), ainsi que la dexametasone et les corticoïdes de synthèse, agonistes des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR), utilisés comme anti-inflammatoires (5).

Leur modulation pharmacologique nécessite de connaitre leurs structures, leurs capacités à fixer des ligands (agonistes ou antagonistes), et leurs mécanismes d'action.

I. Les Récepteurs Nucléaires : Généralités

Le génome humain code pour 48 récepteurs nucléaires (6,7). Alors que certains ligands étaient connus avant leurs récepteurs (ex : stéroïdes tels que les glucocorticoïdes et œstrogènes), certains NR qualifiés d'« orphelins » ont été découverts sur la base d'homologie de séquence sans connaissance de leurs ligands (8). Ces derniers peuvent avoir une expression nucléaire constitutive ou migrer dans le noyau après liaison cytosolique à leurs ligands (ex : Récepteur aux androgènes [AR ou NR3C4], aux mineralocorticoïdes [MR ou NR3C2], à la progestérone [PR ou NR3C3], ou GR [NR3C1]). Une grande majorité des NR sont cependant constitutivement liés à leurs éléments de réponse à l'ADN (RE pour *Response Elements*) respectifs, situés dans le promoteur de leurs gènes cibles. Ils possèdent alors la capacité d'induire ou de réprimer la transcription de ces gènes et de réprimer l'action d'autres facteurs de transcription. Ces mécanismes sont dépendants de leurs capacités de fixation à l'ADN, leurs dimérisations et la formation de complexes protéiques. Ces derniers paramètres étant liés à leurs structures (corrélées à leur phylogénie), permettant de classer les NR selon une nomenclature mondialement adoptée.

1. Nomenclature

Les expériences d'alignement de séquence et la construction d'arbres phylogéniques ont permis de créer une classification des NR en 6 groupes (6), constitués par :

Groupe 1 : Les récepteurs aux hormones tyroïdiennes (TR), aux acides rétinoïques (RAR), à la vitamine D (VDR ou NR1I1), les PPAR (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), aussi bien que des récepteurs orphelins tels que les ROR (*retinoic acid receptor-related orphan receptors*), Rev-erb, récepteur constitutif des androstanes (CAR pour *constitutive androstane receptor*), PXR (*Pregnan X Receptor*), LXR (*Liver X Receptors*) et d'autres.

Groupe 2 : Les RXR *(Retynoid X Receptor)*, COUP-TF (*COUP-Transcription Factor)* et HNF-4 *(Hepatocyte Nuclear Factor-4).*

Groupe 3 : Les récepteurs aux stéroïdes dont les ER (*Estrogen Receptors)*, GR, PR, AR ainsi que les ERR (*Estrogen-Receptor-Related Receptors*).

Groupe 4 : Le groupe B des récepteurs orphelins aux facteurs de croissance des nerfs dont NGFI-B (*Nerve growth factor IB*), NURR1 (*Nuclear receptor related 1 protein*) et NOR1 (*Neuron-derived Orphan Receptor 1*)

Groupe 5 : Le facteur steroïdogenique 1 SF-1 (NR5A1) et le récepteur homologue FTZ-F1 de la Drosophile.
Groupe 6 : Le récepteur GCNF1 (NR6A1), qui ne s'apparente à aucun autre groupe.

A noter que cette classification ne prend pas en compte la capacité de liaison des NR à leurs ligands. Elle permet cependant une homogénéisation de la nomenclature qui jusqu'alors était dépendante des noms triviaux des NR qui leur étaient attribués lors de leur découverte (Tableau 1).

Tableau 1 - Récepteurs Nucléaires Humains.
Selon leurs noms triviaux (première colonne à gauche) la nomenclature officielle (NR0xx-NR6xx, colonne centrale) et leurs ligands respectifs (colonne de droite). L'indication « / » dans la colonne des ligands signifie que le récepteur est orphelin. Adapté de la référence (9)

Récepteurs Nucléaires Humains		
Nom	Nomenclature	Ligand(s) naturels ou synthétiques
TRα	NR1A1	Hormones Thyroïdiennes
TRβ	NR1A2	Hormones Thyroïdiennes
RARα	NR1B1	Acide Rétinoïque
RARβ	NR1B2	Acide Rétinoïque
RARγ	NR1B3	Acide Rétinoïque
PPARα	NR1C1	Acide Gras, leukotriene B_4, fibrates
PPARβ	NR1C2	Acides Gras
PPARγ/δ	NR1C3	Acides Gras, prostaglandine J_2, thiazolidinediones
Rev-erbα	NR1D1	/
Rev-erbβ	NR1D2	/
RORα	NR1F1	Cholesterol, cholesteryl sulfate
RORβ	NR1F2	Acide rétinoique
RORγ	NR1F3	/
LXRα	NR1H3	Oxysterols, T0901317, GW3965
LXRβ	NR1H2	Oxysterols, T0901317, GW3965
FXRα	NR1H4	Acide Biliaires, Fexaramine
FXRβ*	NR1H5	Lanostérol
VDR	NR1I1	Vitamine D, 1,25-dihydroxyvitamin D_3
PXR	NR1I2	Xenobiotiques, 16α-cyanopregnenolone
CAR	NR1I3	Xenobiotiques, phenobarbital
HNF4α	NR2A1	/
HNF4γ	NR2A2	/
RXRα	NR2B1	Acide Rétinoïque
RXRβ	NR2B2	Acide Rétinoïque
RXRγ	NR2B3	Acide Rétinoïque
TR2	NR2C1	/
TR4	NR2C2	/
TLL	NR2E2	/
PNR	NR2E3	/
COUP-TFI	NR2F1	/
COUP-TFII	NR2F2	/
EAR2	NR2F6	/
Erα	NR3A1	Estradiol-17β, tamoxifène, raloxifène
Erβ	NR3A2	Estradiol-17β, divers composés synthétiques
ERRα	NR3B1	/
EERβ	NR3B2	DES, 4-OH tamoxifène
EERγ	NR3B3	DES, 4-OH tamoxifène
GR	NR3C1	Cortisol, dexamethasone, RU486
MR	NR3C2	Aldosterone, spirolactone
PR	NR3C3	Progesterone, acetate de medroxyprogesterone, RU486
AR	NR3C4	Testostérone, flutamine
NGFI-B	NR4A1	/
NURR1	NR4A2	/
NOR1	NR4A3	/
SF1	NR5A1	/
LRH-1	NR5A2	/
GCNF	NR6A1	/
DAX-1	NR0B1	/
SHP	NR0B2	/
*FXRβ est un pseudogène. Inactif chez l'homme mais un récepteur au lanosterol chez la souris		

2. Structure

Tous les NR possèdent une homologie de structure. Ils sont constitués de 5 à 6 régions (de A à F, depuis la partie N-terminale à la partie C-terminale) comprenant un domaine de liaison à l'ADN central (DBD pour *DNA Binding Domain,* situé dans la région C) et le domaine de liaison au ligand (LBD pour *Ligand Binding Domaine* situé dans la région E) fonctionnant de manière indépendante l'un de l'autre. Ces deux domaines sont les plus conservés entre les NR. La région A/B variable et la région D sont moins conservées alors que la région F (située dans la partie C-terminale), n'est pas présente dans tous les NR et possède une fonction encore mal définie (Figure 1).

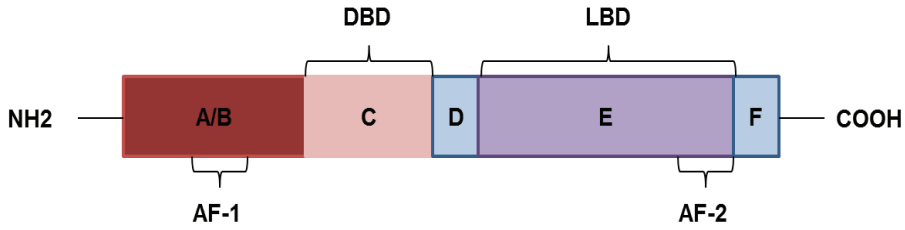


Figure 1 - Structure des récepteurs nucléaires représentés par leurs différentes régions.
De la partie N à C terminale : Région A/B : possédant le domaine de transactivation AF-1 (*activation function 1*) ; C : le domaine de liaison à l'ADN DBD (*DNA Binding Domain*) ; D : région charnière permettant les modifications conformationelles ; E : domaine de liaison au ligand contenant principalement une poche de liaison au ligand et un domaine de transactivation AF-2 permettant le recrutement de partenaires protéiques coactivateurs ; F : région très variable absente chez certains NR.

i. Région A/B : contenant le domaine de transcription AF-1

La région A/B N-terminale, encore faiblement caractérisée, possède un domaine d'activation de la transcription appelé AF-1 (*activation function 1*) servant de site de fixation des coregulateurs. Ce dernier a une activité indépendante de la présence de ligand (10). Cependant, l'activité d'AF-1 est modulée par la liaison d'un ligand au LBD.

ii. Région C : le domaine de liaison à l'ADN (DBD).

Le domaine DBD est un domaine d'approximativement 70 acides aminés, hautement conservé parmi les NR dans sa séquence et sa structure (11). Ce domaine présente un repliement globulaire composé de deux doigts de zinc (Zn I et Zn II), dont chacun des ions Zn^{2+} sont coordonnés par quatre résidus cystéines. Ces atomes sont nécessaires au maintien de la liaison à l'ADN (12). D'autres éléments essentiels à la fonction du DBD sont deux hélices-α situées respectivement entre les deux doigts de zinc (hélice 1) et en C-terminal du second doigt de zinc (hélice 2). L'hélice 1 contenant la boite P, interagit de manière spécifique avec la séquence héxamérique de haute affinité du demi-site du RE de l'ADN (13,14). L'hélice 2 est responsable d'une reconnaissance de l'ADN moins spécifique, mais permet la stabilisation du complexe acide nucléique/protéine par recouvrement de l'hélice 1 (Figure

2B). Une extension C-terminale (CTE pour *C-teminal exension*) du domaine DBD a été observée comme jouant un rôle crucial à sa fonction (15,16), *via* la dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires tel que RXR (17,18), et sa contribution à l'interaction avec l'ADN (19) (Figure 2). La boite D formant la partie centrale du site de dimérisation (20).

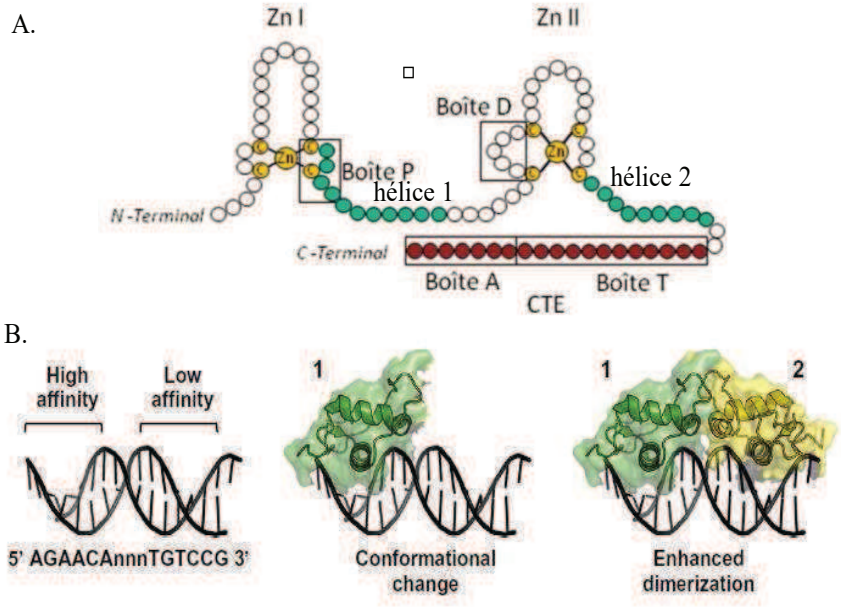


Figure 2 - Domaine de liaison à l'ADN (DBD) et interaction avec l'élément de réponse de l'ADN.
A. Représentation schématique du domaine DBD contenant deux doigts de zinc (ZnI et ZnII), deux hélices α représentées en vert, ainsi qu'une extension C terminale (CTE) en rouge Adapté des référence (21,22). B. Représentation de l'interaction entre un NR (en vert), l'ADN et la dimérisation avec un second NR (en jaune). Adapté de la référence (23)

iii. Région D : domaine charnière entre DBD et LBD

La région D est considérée comme servant de charnière entre les domaines DBD et LBD, permettant aux deux domaines des modifications conformationelles sans encombrement stérique. Ce domaine contient également un signal de localisation nucléaire (24).

iv. Région E : le domaine de liaison du Ligand (LBD).

Cette région a une structure protéique complexe (12 hélices α [H1-H12] articulées autour d'un tour β et deux feuillets β). Elle possède plusieurs fonctions. Les domaines portant ses fonctions sont la poche de liaison du ligand (LBP pour *Ligand Binding Pocket*), une interface de dimérisation, une surface de liaison aux corégulateurs et un domaine de transactivation AF-2 dépendante du ligand qui permet le recrutement de coactivateurs (25,26). La taille, la forme, ainsi que les acides aminés constituant la LBP sont primordiaux pour la fixation (principalement par liaisons hydrogènes) des ligands (cf : Ch.1.I.8). Le domaine LBD a également été observé comme pouvant contribuer à la dimérisation des NR après modification conformationelle par la liaison au ligand (27,28).

v. Région F

Elle n'est pas retrouvée dans tous les NR. Sa fonction reste encore mal comprise.

3. Modifications post-traductionnelles des Récepteurs Nucléaires

Les NR sont des phosphoprotéines dont les fonctions peuvent être régulées par plusieurs types d'effecteurs. La majorité des sites de phosphorylation sont situés dans la région A/B, ainsi que dans les domaines DBD et LBD (29,30). Ces sites peuvent être phosphorylés par les MAPK, la kinase N-terminal du facteur c-JUN et la p38MAPK (31–33). Ces kinases, ainsi que celles activées par d'autres intermédiaires de signalisation (Akt, PKA et PKC) coopèrent avec les ligands des NR pour augmenter ou diminuer leur activité transcriptionelle (34). De ce fait, l'activité des NR peut être régulée par des facteurs extracellulaires (cytokines, facteurs de croissance…) ou intracellulaires, pouvant *via* leurs récepteurs activer différentes kinases. L'activité des NR est donc dépendante du contexte physiologique ou pathologique (35–38).

4. Expression et localisation cellulaire

Comme cité précédemment, les NR peuvent être retrouvés au niveau cytoplasmique et nucléaire. La localisation nucléaire peut être induite par la liaison d'un ligand (comme c'est le cas pour les AR(39), GR(40), VDR (41)), ou préférentielle, indépendamment des ligands (comme c'est le cas pour les PR(42), TR(43), ER (44), RXR (45), LXRα (46) et LXRβ (47)). Cependant, un trafic nucléo-cytoplasmique a été observé pour plusieurs d'entre eux (43,48–52). Celui-ci fait intervenir une protéine cargo de type karyophérine (53), qui se lie aux NR par leurs séquences de localisation nucléaire (NLS) (54,55). Des séquences NLS ont été identifiées dans le domaine DBD, la région charnière D et le domaine LBD (47). La modulation de la localisation cellulaire des NR représente une approche supplémentaire de la modulation de leur activité. Par exemple, il a été observé que l'activation du récepteur au TGF-β, ALK-1, entraine le recrutement cytoplasmique de LXRβ sans affecter la localisation de LXRα. L'interaction entre LXRβ et ALK-1 conduit à une inhibition de la signalisation du TGF-β (56).

i. Localisation nucléaire

Les NR localisés au niveau nucléaire sont fixés à leurs RE. Ces séquences sont présentes dans les sites promoteurs des gènes cibles des NR. Elles sont composées de deux demi-sites hexamériques, pouvant être répétés de manière directe, indirecte ou inverse et séparés par des séquences de 1 à 5 nucléotides. Les éléments de réponse peuvent donc être caractérisés selon : 1) la séquence

nucléotidique des demi-sites, 2) le nombre de paires de bases les séparant et 3) l'orientation relative de ces motifs. Les NR peuvent être classés selon leur mode de fixation à l'ADN.

Les récepteurs aux stéroïdes fonctionnant en formant des homodimères se lient à des éléments de réponse contenant des demi-sites de motifs hexamères répétés en sens inverse, séparés par 3 paires de bases (IR3, pour *inverse repeat*) (57), (Figure 3A). A l'exception du récepteur aux œstrogènes, ces NR (GR, MR, AR et PR) reconnaissent la séquence consensus 5'-AGAACA-3'. La quasi-totalité des autres NR reconnaissent une ou deux copies de la séquence consensus à l'ADN 5'-AGGTCA-3'. Parmi ces récepteurs, une majorité forme des hétérodimères avec RXR. Ces derniers peuvent se lier à l'ADN sur des séquences à répétition directe (DR pour *direct repeat*) séparées par 1 à 5 paires de bases (DR1 à DR5), (Figure 3B). Enfin, certains NR peuvent se lier à l'ADN sous forme de monomères tel que NGFI-B, Rev-erb, ROR, et SF-1 (21,58–61), (Exemples, Figure 3C). Pour la plupart des RE, un des motifs hexamériques possède une séquence permettant une liaison de forte affinité (dite de haute affinité), alors que le second demi-site possède une séquence plus variable, on parle de site de faible affinité comme montré Figure 2B (62).

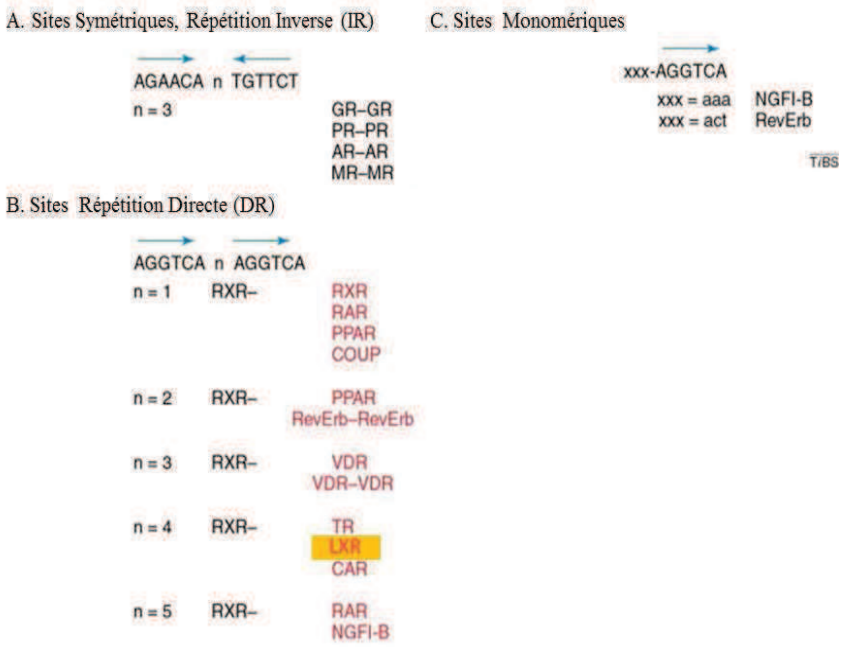


Figure 3 - Les 3 classes d'éléments de réponse de l'ADN aux NR.
A. Les NR aux stéroïdes formant des homodimères se lient à deux demi-sites constitués d'une répétition inverse (IR pour *inverse repeat*) des demi-sites 5'-AGAACA-3' et 5'-TGTTCT-3', séparés par 3 nucléotides d'où la nomenclature IR3. B. Les éléments de réponse des NR formant des hétérodimères avec RXR sont constitués de 2 demi-sites répétés de manière directe et séparés par une séquence de n= 1 à 5 nucléotides, d'où la dénomination DRn (avec DR pour *direct repeat*). C. Les éléments de réponse permettant la fixation de NR monomériques ne contiennent qu'une seul copie de la séquence 5'AGGTCA-3' précédée d'une séquence spécifique xxx variable d'un NR à l'autre. Adapté de la référence (21)

La liaison des NR à leurs éléments de réponse respectifis est indispensable à leur activité transcriptionelle. Cependant, cette liaison est régulée par d'autres facteurs, tel que leurs partenaires de liaison protéique.

5. Mode de liaison à l'ADN

Les NR peuvent être fixés à l'ADN sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. Chaque partenaire se lie à sa séquence d'ADN spécifique, formant des demi-sites de liaison séparés par un nombre variable de nucléotides (cf : Ch1.I.4.i). En 1995, Mangelsdorf et son équipe proposaient une classification de ces récepteurs en fonction de leurs partenaires de liaison à l'ADN (Figure 4). Les NR pouvaient alors être répartis en 4 groupes comprenant (1) des récepteurs aux hormones stéroïdiennes connues, qui fonctionnent en tant qu'homodimères se fixant sur des demi-sites de RE répétés de manière inverse ; (2) des récepteurs formant des hétérodimères avec le partenaire RXR, pouvant être activés par la seul présence d'un ligand à RXR, on parle alors d'hétérodimères permissifs (dont FXR, CAR, LXR, PXR et PPARα/γ). Les hétérodimères non-permissifs ne pouvant s'activer par liaison de RXR seul, et montrant un effet synergique du ligand du NR associé à RXR (ex : T_3R, RAR, VDR) (63) ; (3) des récepteurs orphelins qui fonctionnent comme des homodimères se liant à des motifs RE répétés de manière directe, ou (4) fonctionnant comme des monomères se liant à des sites élément de réponse simples (3).

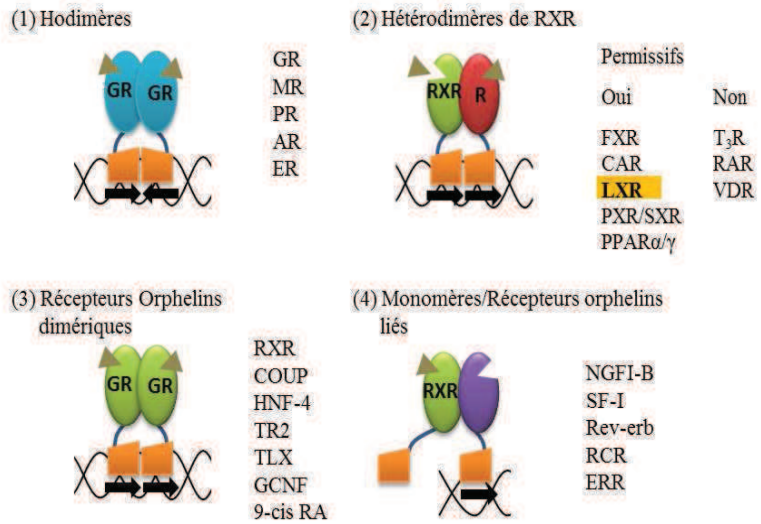


Figure 4 - Fixation des NR sur leurs éléments de réponse à l'ADN et partenaires protéiques.
Les NR peuvent être répartis en 4 classes en fonction de leur homo/dimérisation sur l'ADN. (1) Récepteurs aux hormones stéroïdiennes à fixation homodimérique sur des séquences à répétition inverse (IR) ; (2) NR formant des hétérodimères permissifs ou non-permissifs avec RXR se fixant sur des séquences à répétition directe (DR). Ces dernier sont qualifiés de pemissifs lorsqu'ils peuvent être activés par les ligands d'un des deux partenaires ou des deux entrainant un effet synergique ; (3) Récepteurs orphelins formant des homodimères se fixant sur des séquences DR ; Récepteurs orphelin à fixation monomérique pouvant être liés à un RXR non fixé à l'ADN. Adapté des références (64,65).

6. Activité transcriptionelle

La première étape de la régulation de l'activité transcriptionelle des NR est la liaison d'un ligand au LBD du récepteur (66). La fixation d'un ligand à la LBP entraine une modification conformationelle dépendante de la nature agoniste ou antagoniste de ce dernier, permettant la fixation d'un complexe corégulateur (coactivateur ou corepresseur) sur la partie AF-2. Dans le cas d'une interaction avec un complexe corépresseur, ce dernier va bloquer stériquement l'hélice 12 du LBD, l'empêchant d'acquérir sa conformation active (67). Ces corégulateurs ne sont pas spécifiques, mais communs à plusieurs NR (68).

i. Les complexes corégulateurs

Les complexes corégulateurs sont des complexes protéiques possédant une activité enzymatique permettant de modifier l'acétylation/méthylation des histones, modifiant le repliement de la chromatine, et donc la possibilité de transcription du génome (69). L'absence de ligand permet aux NR présents sur leur RE de fixer un complexe corépresseur. Ce dernier est composé courrament des protéines NCoR et SMRT qui permettent le recrutement de partenaires protéiques possédant une activité histone déacétylase (HDACs). Celle-ci est responsable du repliement de la chromatine, inhibant la transcription du gène cible. De plus, il a été observé que le complexe corépresseur peut inhiber le complexe transcriptionnel par interaction protéine/protéine. Ces complexes corépresseurs peuvent également être associés aux NR, lorsque ces derniers sont liés à un antagoniste (détaillé ci-dessus). Suite à la liaison d'un agoniste, le changement conformationnel du LBD des NR entraine la libération du complexe corépresseur et la fixation d'un complexe coactivateur. Ce complexe est constitué de plusieurs partenaires protéiques permettant : (A) la modification des histones par les membres de la famille des p160, CARM et CBP/p300 qui possèdent (ou recrutent les protéines possédant) les activités enzymatiques acétyl- et méthyltransférase ; (B) le remodelage de la chromatine de manière dépendante de l'ATP (les membres de la famille Swi/Snf qui alterent les structures et positions des nucléosomes) ; (C) l'assemblage du complexe transcriptionel (ex : *via* TRAP/DRIP). Des coactivateurs peuvent être préférentiellement recrutés par certains NR, avec la capacité pour un NR de recruter plusieurs coactivateurs. (Figure 5).

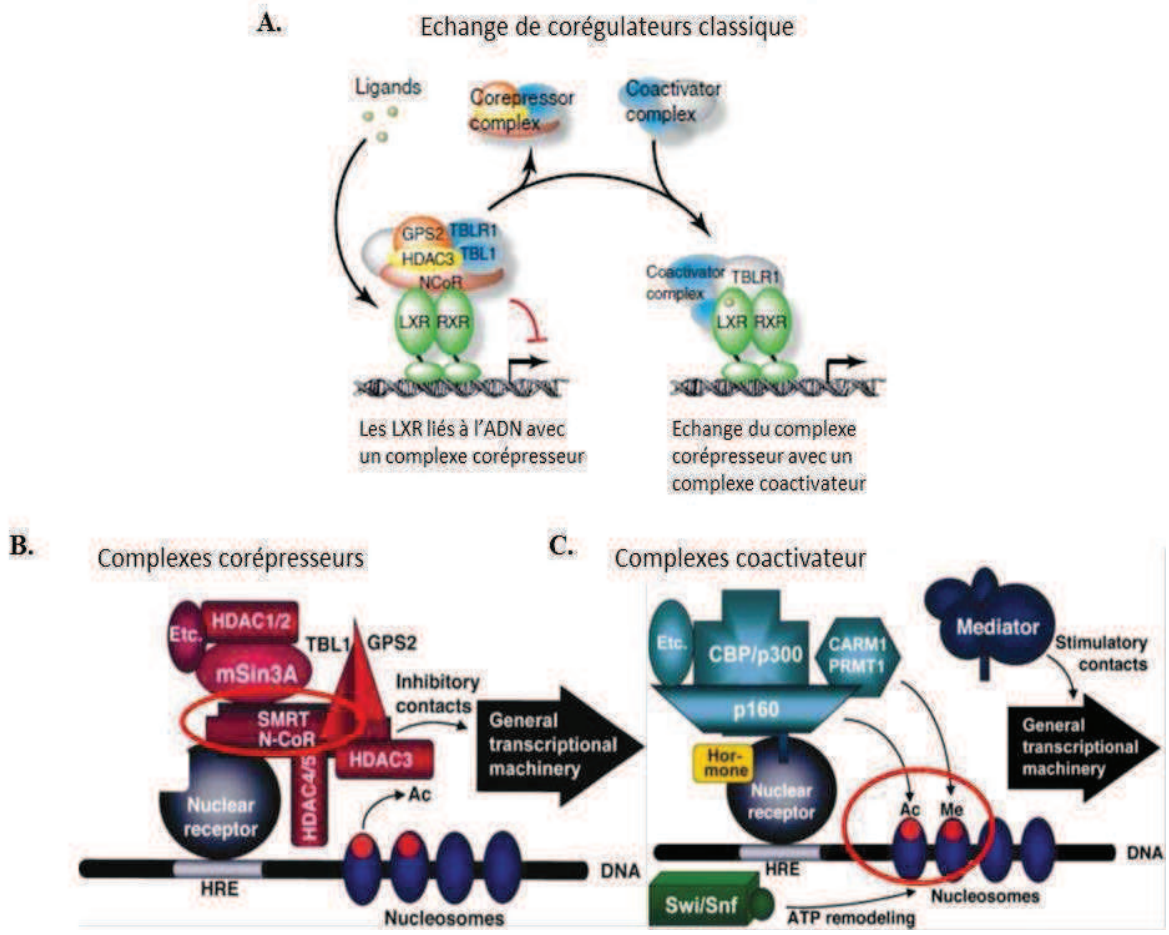


Figure 5 - Complexes corépresseurs, coactivateurs et échange dépendant du ligand.
A. La liaison d'un ligand agoniste au NR entraine un changement conformationel de ce dernier, libérant le complexe corégulateur et recrutant un complexe coactivateur permettant la transcription du gène cible. B. Les complexes coactivateurs sont composés de plusieurs enzymes permettant le dépliement de la chromatine (Acétyl/Méthyl-transférase) et l'activation du complexe de transcription génique. C. Les complexes corépresseurs contiennent les protéines SMRT et N-COR, qui permettront le recrutement de partenaires enzymatiques inhibant la transcription. Adapté de la référence (70)

Bien que ce modèle d'échange ait été identifié pour la majorité des NR, certains corépresseurs sont dépendants des ligands, comme la protéine RIP140 (*« Receptor-interacting protein-140 »*) qui peut entrer en compétition avec les coactivateurs en déplaçant ces derniers (71,72). D'autres membres de la superfamille des NR peuvent également réprimer la transcription génique par des mécanismes alternatifs impliquant par exemple la protéine DAX-1 se liant au domaine d'activation AF-2 des NR conduisant à un modèle en deux étapes d'inhibition, impliquant une compétition avec les coactivateurs et une répression active de la transcription. Un modèle complémentaire d'activation de la transcription par les NR a été observé pour les LXR. Ce dernier fait intervenir une déméthylation des histones induite par le ligand, permettant de révéler des sites de fixation spécifique du NR sur lesquels ils pourront se fixer et recruter un complexe de coactivation (73).

7. Interférence transcriptionelle

La régulation de la transcription génique par les NR ne se restreint pas à leurs gènes cibles. Ils peuvent interagir avec d'autres voies de signalisation par des mécanismes d'interférence transcriptionnelle. Il a été identifié pour les LXR et PPAR un mécanisme de transrépression faisant intervenir la liaison de protéines SUMO-1 ; 2 ou 3 (pour *Small Ubiquitin-like Modifier*), suite à la liaison d'un ligand. Les NR SUMOylés peuvent se fixer aux complexes corépresseurs, liés à des facteurs de transcription sur les promoteurs de leurs gènes cibles. Ceci a pour conséquence de bloquer la libération du corépresseur, et donc la transcription du gène cible (Figure 6A) (74–76).

Il a également été observé une interaction directe du NR SUMOylé avec le facteur de transcription cible, empêchant sa liaison à l'ADN (Figure 6B). C'est le cas pour les LXR SUMOylés (SUMO2/3 pour LXRα et SUMO1 pour LXRβ) qui peuvent interagir avec STAT1 phosphorylé, inhibant sa fixation sur le promoteur de gènes cibles (77).

D'autres mécanismes de transrepression impliquant la liaison directe du NR avec le facteur de transcription cible, permettant le recrutement de corépresseur (ex : GR (78)) (Figure 6C) ; le « démantèlement » du facteur de transcription sur son site promoteur par interaction directe du NR et recrutement de partenaire enzymatique forçant le *turnover* du facteur de transcription (ex NURR1/NF-κB(p65) (Figure 6D), (79)), ou encore l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription (LXR/NF-κB, (80)) (Figure 6E).

Ces mécanismes impliquent des modifications post-transcriptionnelles des NR, telles que la SUMOylation illustrée ci-dessus, l'acétylation, l'ubiquitinilation et la méthylation révélant une grande complexité de la dynamique de régulation de la transcription par les NR qui ne dépend pas uniquement de ses ligands (81,82).

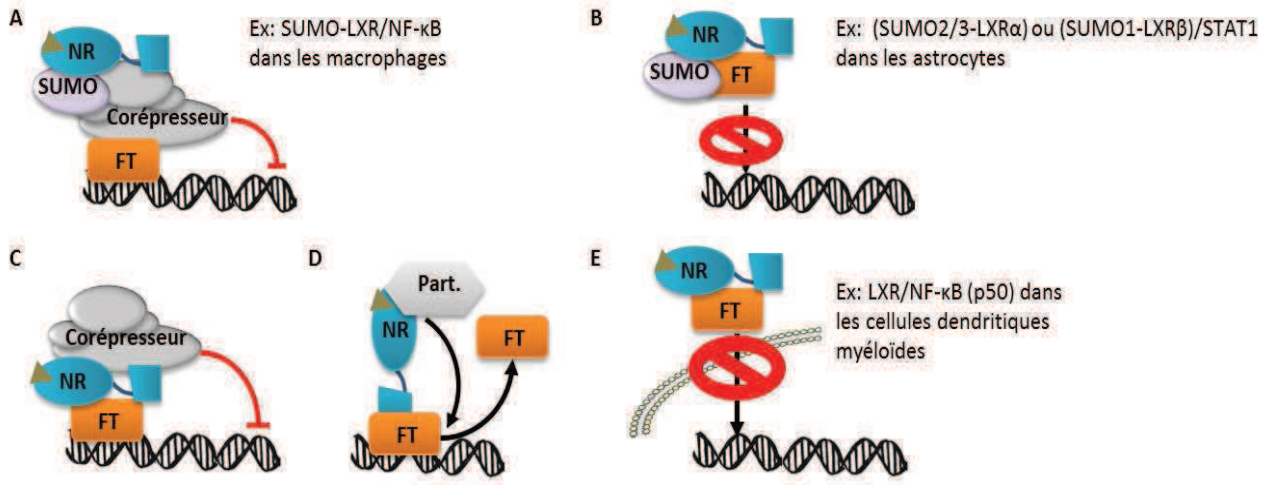


Figure 6 - Modèle de régulation de la transcription par les récepteurs nucléaires.
Représentation schématique des principaux mécanismes de transrépression identifiés. (A) Blocage du corépresseur (ex : SUMO-LXR inhibant l'activité transcriptionnelle de NF-κB (83)) ; (B) inhibition de la fixation à l'ADN (ex : SUMO2/3-LXRα ou SUMO1-LXRβ inhibant la fixation de STAT1 à son promoteur dans les astrocytes (77)) ; (C) Recrutement de corépresseur ; (D) Recrutement de partenaire enzymatique puis dissociation du facteur de transcription de l'ADN ; (E) Inhibition de la translocation nucléaire (ex : LXR/NF-κB (p50) dans les cellules dendritiques myéloïdes (80). Abréviations : NR : Récepteur nucléaire ; FT : Facteur de Transcription ; Part. : Partenaire enzymatique. Adapté de la référence (84)

8. Les différentes classes de ligands

Les ligands des NR sont responsables de la modification conformationelle du domaine LBD, entrainant des modifications des sites d'interactions protéiques présents sur les NR. Ceci a pour conséquence de modifier la localisation cellulaire des NR, les interactions protéines/protéines (échange coactivateur/corépresseur), et finalement l'activité transcriptionelle ou de transrépression des NR. La spécificité du ligand dépend de sa structure chimique et des interactions créées avec les acides aminés présents au sein du domaine LBP. Le mode d'action classique du ligand est de stabiliser l'hélice alpha 12 (H12) au sein du domaine AF-2 du LBD, dans sa conformation active (effet agoniste). Cependant, en fonction de sa structure chimique, le ligand pourra activer des fonctions spécifiques du NR (*via* la stabilisation de différentes conformations de l'AF-2 et son interaction avec le domaine AF-1 présent dans la région A/B du NR), ainsi qu'agir sur les NR de manière spécifique du tissu l'exprimant, ce qui fonde la base du développement de molécules thérapeutiques ciblant les NR (85).

i. Les antagonistes

Les structures cristallographiques des complexes formés par le domaine LBD de l'ERα en présence des anti-oestrogènes raloxifène et 4-hydroxytamoxifène, ainsi que la structure du complexe composé du domaine LBD (RARα) avec BMS614, ont permis de démontrer l'effet d'une chaine latérale

volumineuse qui empêchait l'hélice alpha H12 d'acquérir sa conformation active (86–88). Il y a alors inhibition de l'interaction avec les coactivateurs. Ces antagonistes d'AF-2 sont considérés comme purs. Un antagoniste de ERβ a montré une inhibition de la stabilisation de l'hélice alpha 12 l'empêchant d'interagir avec le reste du domaine LBD (89). D'autres antagonistes présentent cependant des structures analogues aux agonistes de leurs NR respectifs (ex : la Flutamide et la Progestérone, des antagonistes puissant de l'AR et MR respectivement) faisant intervenir d'autres mécanismes d'inhibition (66).

ii. Les agonistes inverses

Ils se caractérisent par leur capacité à inhiber l'activité de transcription basale de certains NR, ou la stabilisation de la liaison avec des corépresseurs par interaction à un site différent des agonistes ou antagonistes classiques. C'est le cas pour GW6471 qui stabilise l'interaction de PPARα avec le corépresseur SMRT par la création d'un site d'interaction hydrophobe (67), ainsi que les diethylstilbestrol et 4-hydroxytamoxifène qui inhibent l'activité de transcription basale de l'ERRγ par modification conformationelle de son domaine LBD (90).

iii. Les agonistes/antagonistes partiels

Ces composés possèdent une activité réduite par rapport aux agonistes ou antagonistes classiques, et montrent une activité dépendante du contexte cellulaire. C'est le cas pour GW0072 (agoniste partiel de PPARγ) qui stabilise faiblement l'hélice alpha 12 dans sa conformation active. La conformation finale (agoniste ou antagoniste) dépendra de la concentration intracellulaire de coactivateur ou corépresseur (9). Parmi ces derniers, les SNuRMs (pour *Selective Nuclear Receptor Modulators*) permettent un effet agoniste ou antagoniste spécifique du tissu, dépendant de la présence de corégulateurs (91).

II. Les Liver X Receptors

Les LXR sont des récepteurs nucléaires exprimés sous deux isoformes dans l'organisme : LXRα (NR1H3) et LXRβ (NR1H2). LXRβ a une expression ubiquitaire, alors que LXRα est principalement exprimé dans les tissus ayant une activité métabolique du cholestérol tels que le foie, l'intestin, les reins, les adipocytes et la rate (92). Ils ont une localisation nucléaire préférentielle en l'absence de ligands (46,47), formant des hétérodimères permissifs avec les RXR (pouvant être activés par un ligand de RXR tel que l'acide 9-cis rétinoïque). Idéalement, l'hétérodimère se fixe sur un élément de réponse au LXR (LXRE) constitué de deux séquences hexamériques (AGGTCA) répétées de manière directe et séparées de 4 nucléotides (DR4). Cependant, l'analyse des promoteurs des gènes cibles des LXR montre la présence de nucléotides invariants, ainsi que d'autres très variables. La séquence consensus est la suivante :[G/T/A]G[G/T]T[C/T]A-4n-[C/A/T]G[G/T][T/G]CA, avec les variations observées entre les crochets [] (93). Ainsi, bien que les deux isomères de LXR aient la même affinité de liaison au LXRE « idéal », leur affinité, et donc leur fixation préférentielle à l'ADN est dépendante de la séquence des LXRE (93,94). En absence de ligand, l'hétérodimère est lié à un complexe corépresseur. La liaison de LXR ou RXR à son ligand entraine une modification conformationelle des NR, entrainant l'échange corépresseur/coactivateur, permettant la transcription du gène cible en aval. Une activité de transrépression par les LXR peut également être observée selon plusieurs mécanismes (Chapitre I.7). Par ces fonctions, les LXR ont principalement été impliqués dans le métabolisme du cholestérol et dans la modulation de la réponse inflammatoire. Leur régulation dans ces deux contextes est dépendante de la présence ou non de ligands.

1. Modulation de l'activité des *Liver X Receptors* par les ligands

i. Agonistes naturels

Il est communément admis que les ligands physiologiques majeurs des LXR sont des dérivés oxygénés du cholestérol nommés « oxystérols » (95,96). Ils peuvent être issues de la **stéroïdogenèse** (permettant la formation du 22(R)-hydroxycholestérol et le 20α,22-dihydroxycholestérol), de la **biosynthèse du cholestérol**, de la dégradation du cholestérol par les « **stérols hydroxylases** », générés par réactions non enzymatiques (par action des espèces réactives de l'oxygène [ROS]) ou délivrés par l'alimentation (95).

Les LXR ont une activité de régulation du cholestérol intracellulaire. **La voie de biosynthèse du cholestérol** (voie du mévalonate) génère le 24(S),25-époxycholestérol qui pourra activer les LXR. Les **hydroxylases** jouent un rôle important dans la dégradation et l'efflux du cholestérol vers le foie,

pour son élimination ultime de l'organisme (Figure 7). Cette voie est particulièrement impliquée dans la régulation du cholestérol cérébral, étant donné que les HDL et plus généralement le cholestérol ne peuvent pas franchir la membrane hémato-encéphalique empêchant les modes d'efflux classiques (Ch1.III.3). Le cholestérol est dégradé dans les neurones par l'enzyme CYP46, qui génèrera le 24(S)-hydroxycholestérol (24(S)-HC), un puissant agoniste de LXR (97). Le 24(S)-HC, contrairement au cholestérol, peut franchir la barrière hémato-encéphalique (98) pour être dégradé par le foie en 7α,24(S)-dihydroxycholestérol ou directement excrété en acides biliaires (99). De manière analogue au 24(S)-HC, le cholestérol peut être dégradé en 27-hydroxycholesterol (27-HC), un agoniste des LXR, permettant son efflux. L'enzyme CYP27 (génératrice du 27-HC) catalyse 3 étapes d'oxydation consécutives permettant la dégradation du cholestérol en acide cholesténoïque (un autre agoniste de LXR) qui pourra comme le 27-HC être excrété de la cellule, indépendamment des HDL. Le 27-HC plasmatique pourra être dégradé au niveau hépatique en 7α,27-dihydroxycholestérol puis en acide chemodéoxycholique qui pourra être excrété (100). Trois autres oxystérols sont retrouvés de manière endogène, possédant cependant une génération plus restreinte : le 4β-hydroxycholestérol généré dans le foie et l'intestin (101), le 25-hydroxycholestérol (102), ou possédant une faible propriété agoniste des LXR (7α-hydroxycholestérol (103)).

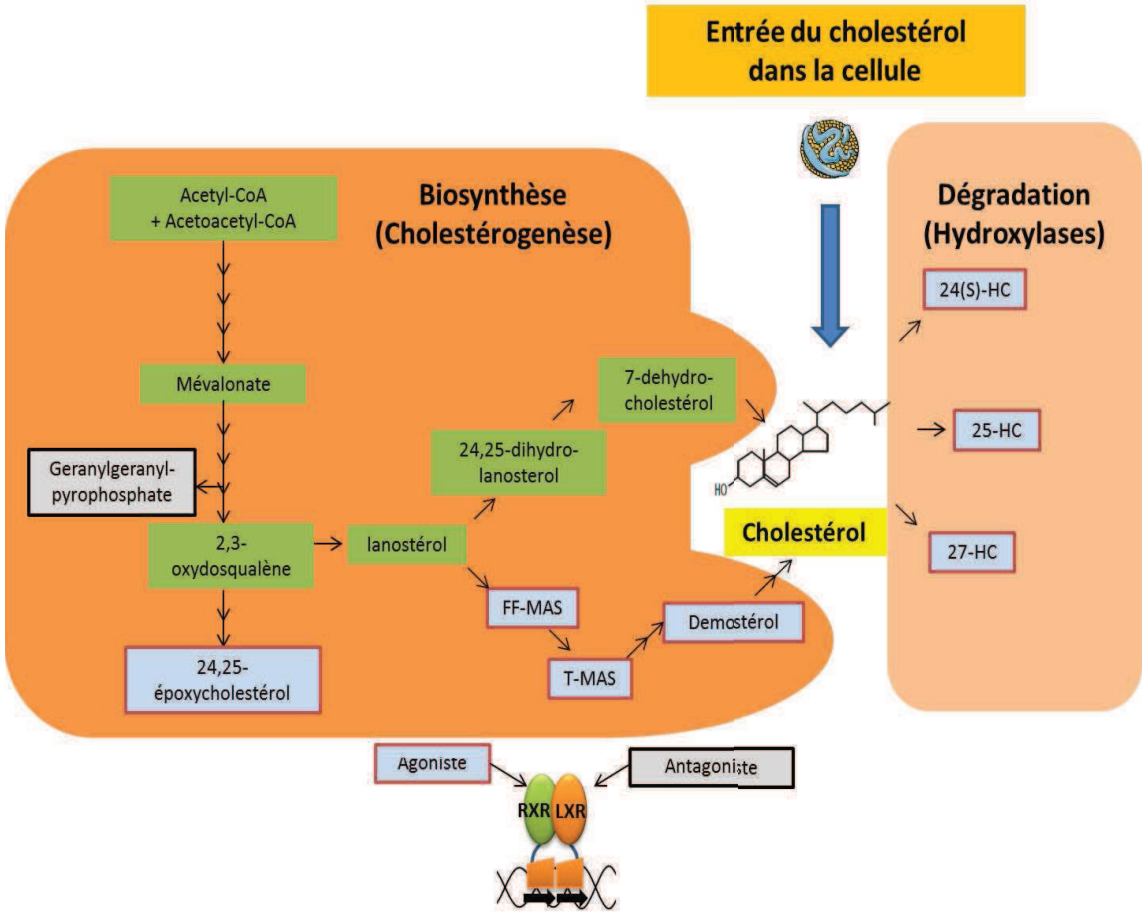


Figure 7 - Voies métaboliques du cholestérol et synthèse de ligands naturels des LXR.
Biosynthèse du cholestérol par la voie du mévalonate (gauche), dégradation du cholestérol pénétrant dans la cellule ou de la biosynthèse, par les hydroxylases (droite). Abréviations : T-MAS : 4,4-dimethyl-5a-cholesta-8,24-dien-3b-ol ; FF-MAS : 4,4-dimethyl-5a-cholesta-8,14,24-trien-3b-ol ; -HC : Hydroxycholestérol. Adapté de la référence (104,105)

Les oxystérols générés par les ROS sont principalement retrouvés dans des circonstances pathologiques (7-keto-, 7α-hydroxy-, 7β-hydroxy-, 5,6-epoxycholestérol, et 3β,5α,6β-trihydroxycholestane). Ces derniers ont une faible affinité pour les LXR, mais sont les principaux oxystérols constituant les oxLDL et entrainant des effets défavorables tel que l'inhibition de la vaso-relaxation dépendante de l'endothélium (106) et l'apoptose monocytaire (107). Depuis que la concentration en 7β-hydroxycholestérol est corrélée avec l'épaisseur de l'intima-media artérielle (108) et est réduite par traitement antioxydant (109), ces oxystérols sont considérés comme impliqués dans la pathogenèse de maladies associées aux stress oxydatifs, comme l'athérosclérose (108,109).

Il a été observé que d'autres molécules issues de la voie de biosynthèse du cholestérol ont un fort potentiel agoniste des LXR. C'est le cas du 24-déhydrocholestérol, aussi appelé desmostérol ; 4,4-diméthyl-5α-cholesta-8,14,24-triène-3β-ol aussi appelé FF-MAS ; 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8,24-

diène-3β-ol aussi appelé T-MAS (104). Enfin, il a également été rapporté que le glucose et le glucose-6-phosphate pouvaient activer les LXR (110).

Alors que les oxystérols sont des ligands naturels des LXR ayant pour majorité une activité agoniste, certaines molécules présentent des caractéristiques antagonistes des LXR.

ii. Antagonistes naturels

Le géranylgéranylpyrophosphate, un des intermédiaires de la voie des mévalonates a été décrit comme antagoniste de l'activité transcriptionelle de LXRα et LXRβ en inhibant leur liaison avec les complexes coactivateurs (111,112). Cet effet inhibiteur est aussi induit par des sulfonates de cholestérol oxydés (113,114). Certains acides gras polyinsaturés (comme les acides arachidonique, eicosapentaénoïque, docosahexaénoïque et linoiléïque) sont des antagonistes de compétition avec les agonistes LXR (115,116).

2. Autres modes de régulation

D'autres mécanismes de modulation de l'activité des LXR ont été observés. Ils passent notamment par la modulation de la transcription des LXR par d'autres facteurs de transcription, les modifications post-traductionnelles, ainsi que la modulation des gènes contenant des LXRE par d'autres facteurs de transcription. Ces différents mécanismes ainsi que les effets des ligands naturels vus ci-dessus sont résumés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 - Modulation des LXR.
***L'Acide Hyocholique (HCA pour *Hyocholic Acid*) et Acide Hyodeoxycholique (HDCA pour *Hyodeoxycholic Acid)* sont des agonistes spécifiques de LXRα. ** Seule l'expression de LXRα est régulée. ***ALK-1 phosphoryle uniquement LXRβ.**

Ligands Naturels	
Agonistes	Antagonistes
22(R)-Hydroxycholestérol	géranylgéranylpyrophosphate
24(S), 25-époxycholestérol	Acides gras polyinsaturés
24(S)-Hydroxycholestérol	Oxystérol 3-sulfonates
25-Hydroxycholestérol	
27- Hydroxycholestérol	
FF-MAS/T-MAS	
HCA, HDCA*	
Glucose	
Expression des LXR	
Augmentation	Diminution
PPARα et γ agonists	17β-estradiol
Insuline	Lipopolysaccharide
IL-10	Cyrokines proinflammatoires (dont IL-1β, TNFα)
Agonistes LXR**	Stress oxydatif
Produits de péroxydation des Lipides (par stimulation de PPARγ)	
Modulation posttransaltionelle de l'activité des LXR	
Augmente	Diminue
cAMP (stimule la liaison au CNRE)	Phosphorylation par : -cAMP-Protéines kinase A (inhibe la liaison au LXRE) -ALK-1*** D'autres NR rentrant en compétition avec les LXR pour la liaison aux RXR (PPARα, PPARγ, VDR, TRβ, FXR) Complexe non-fonctionnel avec PPARα
Moduation des gènes contenant les LXRE par d'autres NR	
Liaison de TRβ1 au LXRE en présence de T_3	Liaison de TRβ1 au LXRE en l'absence de T_3

Abréviations : T3 : triiodothyronine, ligand des TR ; TRβ1 : thyroid hormone receptor β1 ; CNRE : cAMP-negative response element, Adapté de la référence (104)

III. Implication des *Liver X Receptors* dans le métabolisme du cholestérol.

Comme décrit ci-dessus, l'activation des LXR est régulée par plusieurs intermédiaires du métabolisme du cholestérol. Cet élément est un constituant essentiel des membranes plasmiques des cellules et de la communication intercellulaire via la formation d'hormones stéroïdiennes (117). La dérégulation de son homéostasie est associée à de nombreuses circonstances pathologiques, dont les pathologies malignes (dont carcinome, adénome et fibrosarcome) (118), et des maladies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose (119). Les LXR sont impliqués dans le contrôle de son homéostasie à travers la régulation de son entrée dans la cellule, de sa biosynthèse et de son efflux en vue de son élimination de l'organisme.

1. Entrée du cholestérol dans la cellule

Le cholestérol provenant de la nourriture est initialement absorbé par les entérocytes du petit intestin qui l'« emballe » avec les triglycérides en lipoprotéines nommées « chylomicrons ». Une partie des triglycérides sont hydrolysés lors de la circulation, et de nouvelles apoplipoprotéines telle que l'apolipoprotéine E (ApoE), sont ajoutées pour former des chylomicrons rémanents qui seront pris en charge par les hépatocytes. Les hépatocytes, sécrètent alors les lipides sous forme de lipoprotéines de très faibles densités (VLDL pour « *very low density lipoproteins* ») qui sont modifiées dans la circulation en lipoprotéines de faible densité (LDL pour *« low density lipoproteins »*) délivrant le cholestérol aux cellules périphériques.

L'internalisation des lipoprotéines circulantes fait intervenir des récepteurs aux lipoprotéines qui appartiennent à la famille des récepteurs au LDL (LDLR), comprenant notamment les LDLR, VLDLR, LRP5/6, LRP1, et LRP2. Les LDLR ont une expression ubiquitaire. Ils peuvent se lier aux apolipoprotéines contenues dans les LDL, les VLDL et les chylomicrons.

Le complexe récepteur/ligand est alors internalisé, conduisant au recyclage des récepteurs à la membrane cellulaire, alors que les lipoprotéines seront dégradées dans les lysosomes.

La dégradation des lipoprotéines fait intervenir les acides lipases (dégradation des esters de cholestérol et triglycérides), alors que le cholestérol libre peut quitter l'endosome pour intégrer les membranes d'autres compartiments cellulaires tels que la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. Le cholestérol du réticulum endoplasmique pourra être estérifié par l'acyl-CoA cholestérol acyltransferase (ACAT) pour être stocké sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol.

Cette dégradation permet la génération de ligands de LXR (ex : 27-hydroxycholestérol par la stérol 27-hydroxylase (120)), induisant l'expression de la protéines IDOL (*Increased Degradation of LDL Receptor Protein*) responsable de la dégradation des LDLR et VLDLR par le protéasome (121). Ce mécanisme impliquant LXR permet donc de limiter l'entrée du cholestérol dans les cellules, et son accumulation.

Il est à noter que les modifications des particules de lipoprotéines (ex : LDL acétylés ou oxydés) peuvent modifier la voie d'entrée du cholestérol dans les cellules, échappant donc au contrôle présenté ci-dessus.

Il a été observé que les LDL acétylées montraient une prise en charge par les macrophages 100 fois supérieure aux LDL natives, impliquant une interaction par un site membranaire de haute affinité (122). De même les LDL oxydées reconnaissent le complexe TLR4/MD2 ainsi que des récepteurs « *scavenger* » tels que CD36 et SRA, entrainant l'accumulation du cholestérol dans les macrophages, contribuant à la physiopathologie de l'athérosclérose (78,123,124).

2. Biosynthèse du cholestérol

Le cholestérol synthétisé *de novo* représente 70% du cholestérol corporel total (125). Cette biosynthèse passe par la voie du mévalonate, une cascade enzymatique hautement régulée par les facteurs de transcription de la famille des SREBPs.

Les SREBPs sont des protéines présentes à la membrane du réticulum endoplasmique, possédant des parties N- et C-terminales cytoplasmiques, dont la partie N-terminale possède une activité transcriptionelle. Les SREBPs forment un complexe avec SCAP (*SREBP-cleavage activating protein*), dont le domaine de reconnaissance des sterols lui permet de se lier au cholesterol et de se lier avec la protéine de retention INSIG (*insulin-induced gene*). Cette protéine empêche le transport du complexe SREBP/SCAP vers le Golgi. Ceci a pour effet de limiter l'activation protéolytique de l'activité transcriptionelle de SREBP (Figure 8).

Au contraire, en condition de faible concentration intracellulaire en cholestérol, SCAP escorte les SREBPs vers le Golgi où elles sont clivées. La forme transcriptionnelle active des SREBPs est alors libérée, permettant sa migration dans le noyau, induisant l'expression de gènes codant pour les enzymes de régulation de la synthèse du cholestérol et des lipides. Il a ainsi été observé que la surexpression d'une forme constitutivement active de SREBP dans des hépatocytes murins induisait

une augmentation de 75 fois la transcription du gènes codant pour HMGCR, enzyme contrôlant l'étape limitante de conversion de l'hydroxyl-méthyl glutaryl-coenzyme A en mévalonate (126,127).

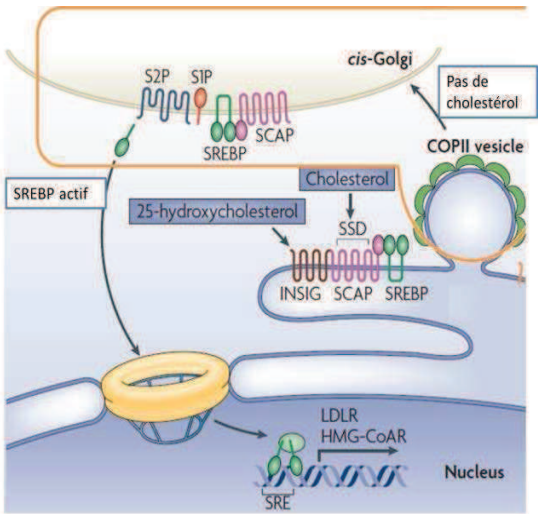


Figure 8 - Schéma de régulation post-traductionnelle des SREBPs.
En condition de concentration intracellulaire en stérols élevée, la protéine de rétention INSIG prévient le transport du complexe SREBP/SCAP vers les vésicules riches en COPII. Ceci empêche le transport vers le Golgi des SREBPs, prévenant leur protéolyse nécessaire à la libération du fragment transcriptionnel actif des SREBPs (pouvant réguler la synthèse du cholestérol *via* HMGCR et l'entrée du cholestérol *via* LDLR). HMGCR subira également la régulation post-traductionnelle par INSIG, qui pourra induire sa dégradation en cas de forte concentration en stérols. Adaptée de la référence (128)

En complément du mécanisme de régulation post-transcriptionnel des SREBPs, ces protéines subissent une régulation transcriptionelle de leurs gènes. La famille des SREBPs comporte 3 membres, codés par 2 gènes : SREBP1a et SREBP1c qui sont des isoformes d'épissage codés par *srebf1*, et SREBP2 codé par *srebf2*. La régulation de ces deux gènes a été observée comme pouvant faire intervenir une boucle d'amplification (129,130), ainsi que d'autres facteurs, dont les LXR (131). Dans des hépatocytes de rats, il a été observé que la stimulation des LXR par un agoniste synthétique induisait l'expression de SREBP2 et SREBP1 (132). SREBP2 a une expression ubiquitaire, et est considéré comme un facteur de transcription primordial à la régulation des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol, telles que la HMG-CoA synthase, HMGCR, la farnésyl diphosphate synthétase, et la squalène synthétase, ainsi que dans l'expression du LDLR.

Bien que ces données semblent impliquer les LXR dans l'augmentation de la cholestérogenèse, il a été observé que LXRα régulait négativement deux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol : la squalène synthétase (FDFT1) et la lanostérol 14a-déméthylase (CYP51A1). Cette régulation a pour effet une inhibition de HMGCR, et donc de la voie des mévalonate (133).

Ainsi, l'activation des LXR par des agonistes provenant de la dégradation du cholestérol (ex : 27-hydroxycholestérol), d'intermédiaires de la voie des mévalonates (ex : desmostérol) ou encore de voies détournées (ex : 24(S),25-epoxystérol (134)), a pour effet de réprimer la biosynthèse du cholestérol.

3. Efflux du cholestérol cellulaire

L'efflux du cholestérol est un processus par lequel le surplus de cholestérol cellulaire est excrété vers le foie, principalement *via* les HDL, puis converti en acides biliaires ou directement sécrété dans la bile pour son élimination dans les fèces. On parle de transport inverse du cholestérol ou RCT (pour *"reverse cholesterol transport"*). Cet efflux a été observé comme faisant intervenir principalement les transporteurs de la famille ABC (pour *« ATP binding cassettes »*), ABCA1 et ABCG1, ainsi que des apolipoprotéines se liant au cholestérol pour son transport dans le plasma (dont ApoAI et ApoE). L'expression des protéines ABCA1, ABCG1 et ApoE est inductible par activation des LXR (*via* les oxystérols issus de la dégradation du cholestérol ou de la cholestérogenèse).

L'importance d'ABCA1 dans l'efflux du cholestérol est illustrée par ses mutations à l'origine du syndrome de Tangier, associant un faible taux de HDL plasmatiques, ainsi qu'une accumulation de cholestérol tissulaire dans de multiples organes (135–137). L'efflux du cholestérol cellulaire est rendu possible par la présence d'apolipoprotéines pauvres en lipides, telles que l'ApoA1, principalement produite au niveau hépatique et intestinal (70% et 30% respectivement) (138). Une interaction fonctionnelle entre ApoA1 et ABCA1 permet alors le transfert de phospholipides et cholestérol cellulaire vers l'ApoA1, donnant naissance à des particules discoïdales enrichies en cholestérol libre. Ce cholestérol sera estérifié en ester de cholestérol par l'enzyme plasmatique lécithine/cholestérol acyltransferase (LCAT), convertissant la particule HDL discoïdale en HDL de type 3, sphérique (139). Cette dernière pourra encore accepter du cholestérol non-estérifié et des phospholipides grâce à ABCG1, permettant grâce à l'action de LCAT une augmentation de la taille de la particule en HDL de type 2. L'efflux de cholestérol par ABCA1 est également rendu possible par d'autres apolipoprotéines pauvres en lipides, comme ceci a été montré pour ApoE (140). ApoE (contrairement à ApoA1) est également produite au sein de plusieurs organes périphériques, tels que le cerveau, ou par des cellules du système immunitaire comme le macrophage (141). Dans ce dernier, l'ApoE peut induire l'efflux de cholestérol de manière autocrine ou paracrine (142), et prévenir la formation de cellules spumeuses dans la paroi vasculaire associée à l'athérosclérose. Il a également été démontré que les LXR pouvaient réguler l'expression du cluster ApoC (ApoCI/ApoCII/ApoCIV) dans les macrophages pouvant contribuer à l'efflux du cholestérol (143). Enfin, les LXR peuvent

induire des enzymes de modulation des lipoprotéines, telles que la lipoprotéine lipase (LPL) (144), ou la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) (145). Bien que non impliquées directement dans l'efflux du cholestérol cellulaire, les LPL sont impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides et la prise en charge des esters de cholestérol des HDL par les cellules hépatiques (146). Les PLTP sont impliquées dans le transfert de phospholipides (147) et de cholestérol non estérifié (148) entre les particules de lipoprotéines, ainsi qu'entre les lipoprotéines et les cellules, favorisant la formation de larges HDL sphériques et le relargage d'ApoAI pauvre en cholestérol qui pourra à nouveau accepter le cholestérol cellulaire *via* ABCA1. Contrairement à ABCA1, l'efflux du cholestérol dépendant d'ABCG1 ne semble pas requérir d'interaction directe avec des apolipoprotéines, mais peut avoir lieu directement vers des HDL (149). Ceci rend possible la collaboration entre ABCA1 et ABCG1. ABCA1 convertit les ApoA-1 pauvres en lipides en lipoprotéines naissantes partiellement enrichies, qui constituent des accepteurs efficaces de l'export du cholestérol par ABCG1 (Figure 9) (150,151).

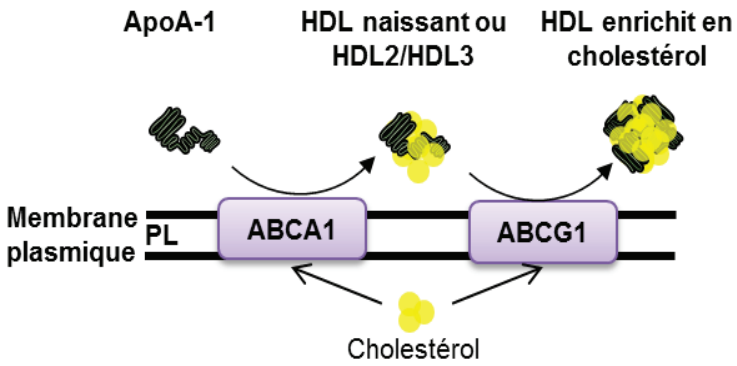


Figure 9 - Schéma illustrant le mécanisme d'efflux du cholestérol impliquant ABCA1/ABCG1.
Les molécules d'ApoA-1 pauvre en lipide, pourront accepter le cholestérol cellulaire, selon un mécanisme d'efflux dépendant d'ABCA1. Leur chargement en cholesterol et phospholipides permettra la formation des HDL naissant. Ces derniers ainsi que des HDL pouvant encore être enrichit en cholesterol (dont HDL2/HDL3) pourront accepter le cholestérol cellulaire, selon un mécanisme d'efflux dépendant d'ABCG1. Abréviations : HDL (*High Density Lipoprotein):* Lipoprotéines de haute densité ; ApoA-1 : Apolipoprotein A-1. ABCA1/G1 *(ATP Binding Cassette A1/G1*) ; PL : Phospholipides ; Adapté de la référence (150).

L'activation de LXR favorisera l'efflux du cholestérol en stimulant la synthèse des transporteurs ABCA1 et ABCG1, des accepteurs ApoE et ApoC, ainsi que des enzymes de modulation des lipoprotéines qui véhiculent le cholestérol sous ses différentes formes dans le milieu extracellulaire et le plasma.

4. Les *Liver X Receptors* diminuent l'accumulation de cholestérol intracellulaire

En conclusion, les LXR limitent l'accumulation du cholestérol intracellulaire :

En limitant l'entrée de cholestérol dans la cellule en induisant la protéine IDOL, une ubiquitinase qui entraine la dégradation des récepteurs aux lipoprotéïnes LDLR et VLDLR (121) ; en inhibant l'expression de deux enzymes clefs de la voie des mévalonates (FDFT1 et CYP51A1) ce qui a pour conséquence de réprimer l'action de HMGCR (133) ; en augmentant l'efflux du cholestérol cellulaire

par l'induction des transporteurs ABCA1/ABCG1, des apolipoprotéïnes acceptrices ApoAI/E/C ainsi que des enzymes permettant le recyclage de ces dernières par modification des lipoprotéines plasmatiques, PLTP et LPL.

IV. Modulation de l'immunité innée par les *Liver X Receptors*

1. Internalisation

Comme énoncé ci-dessus, les LXR régulent l'internalisation de lipoprotéines par modulation de l'expression des récepteurs de la famille LDLR. Les LXR ont également été décrits comme modulant l'internalisation de particules dérivées de cellules, telles que les corps apoptotiques (appelé efferocytose) (152), ainsi que des plaques amyloïdes (153). Ces effets ont été démontrés comme dépendants du récepteur aux phosphatidylsérines, Mertk, membre de la famille des récepteurs TAM avec TYRO3 et AXL. Bien qu'il ait été démontré que le récepteur AXL pouvait être induit par stimulation de RXR (partenaire protéique de LXR), plusieurs études semblent indiquer que la stimulation des LXR par des agonistes synthétiques n'induirait pas AXL (152,153). De même, il n'y a pas de données à l'heure actuelle sur les effets de LXR sur l'expression de TYRO3 et des protéines activatrices solubles des TAM (GAS6 et Protéines S) permettant leur pontage avec les phosphatidylsérines.

D'autres récepteurs impliqués dans l'internalisation ont cependant été décrits comme pouvant être induits par LXR. C'est notamment le cas de la transglutaminase 2 (TGM2), la molécule soluble C1q (fraction du complément), la stabiline-2, TIM4, et CD14 (154,155). De manière intéressante, il a également été observé par une équipe qu'ABCA1 était nécessaire à une bonne phagocytose des corps apoptotiques, et que l'invalidation de la protéine dans un modèle murin conduisait à une diminution de leur clairance (156), ce qui était associé à l'apparition de syndrome auto-immun (glomérulonéphrite) (157). Cette contribution d'ABCA1 à la phagocytose de corps apoptotiques semble passer par une collaboration avec la protéine MEGF10 (158).

Nous pouvons donc constater que bien que l'activation des LXR diminue l'entrée du cholestérol *via* les lipoprotéines, elle augmente la prise en charge de dérivés cellulaires contenant du cholestérol membranaire, qui par sa dégradation en oxystérol pourra stimuler les LXR.

2. Inflammation et facteurs de transcription

i. Régulation de la réponse inflammatoire par les Liver X Receptors

Cette activation des LXR par les dérivés cellulaires internalisés a été démontrée comme participant à la réponse anti-inflammatoire induite par les corps apoptotiques. Ainsi, Gonzalez et ses collègues ont démontré que le contenu en stérols des corps apoptotiques pouvait activer la voie LXR qui à son tour pouvait augmenter la transcription de facteurs immunosuppresseurs (TGFβ et IL-10) (152). Un effet immunosuppresseur a également été observé sur des DC dérivées de monocytes humains. L'ajout d'agoniste LXR durant la différenciation en DC (IL-4 + GM-CSF 7 jours) suivi d'une stimulation par un ligand TLR4 (LPS) augmentait la production d'IL-10 par les moDC (159).

Une diminution de la production de cytokines inflammatoires par activation de la voie LXR a également été démontrée.

Dans l'étude de Gonzalez précédemment citée, l'activation des LXR par les corps apoptotiques diminuait la production des cytokines inflammatoires IL-1β, MCP1 et IL12 (152). L'inhibition de la production des cytokines inflammatoires IL-6, COX2, IL-12p40, IP10, TNFα, iNOS et IL-1Rα induite par stimulation poly(I:C) ou LPS (respectivement ligands de TLR3 et TLR4), a également été observée dans des macrophages murins, par un co-traitement avec des agonistes LXR (160). Cet effet a été rapporté pour des moDC humaines (159), ainsi que des DC dérivées *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse de souris (différenciation en GM-CSF) avec une prévention de la sécrétion d'IL-12 induite par traitement LPS (80). Dans le modèle de moDC, cet effet s'accompagnait d'une diminution de la formation de la synapse immunologique en présence de LTCD4, médiée par la répression de la protéine de remodelage du squelette d'actine : fascine (159). Les effets anti-inflammatoires ont également été démontrés par la prévention de l'expression du récepteur au chimiokines CCR7 par stimulation de LXRα dans des DC infiltrant les tumeurs, prévenant la migration vers les organes lymphoïdes secondaires et l'inhibition d'une réponse T anti-tumorale (161).

Des données tendent cependant à attribuer un effet pro-inflammatoire à la voie LXR. Dans une lignée murine de macrophages (RAW264.7), il a été observé que l'activation de la voie LXR par un agoniste synthétique induisait l'expression d'IFNγ. Le gène codant pour cette cytokine a été montré comme étant sous la dépendance d'un LXRE et donc de l'activité transcriptionnelle de LXR (162). Le gène codant pour TLR4 à également été observé dans des macrophages humains comme étant sous la dépendance d'un LXRE, entrainant une augmentation de la réponse au LPS des macrophages,

pour 48h de prétraitement agoniste LXR (163). De même, la stimulation des LXR dès le premier jour de différenciation de monocytes humains en moDC (5 jours IL-4 + GM-CSF) sensibilisait les moDC à une stimulation TLR4, augmentant l'expression des molécules de costimulation CD80/CD86, la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, TNFα, IL-12p70), la stimulation de NF-κB ainsi que l'activation de lymphocytes TCD4 naïfs (164). Des effets similaires ont été observées sur des DC dérivées de la moelle osseuse de souris (6 jours en présence de GM-CSF) traitées avec un agoniste LXR suivit d'un traitement LPS (stimulation TLR4) (165). Enfin, des moDC humaines immatures ainsi qu'une lignée de DC immature humaine DC2.4 ont montré une augmentation de l'expression de CCR7 induite par traitement agoniste LXR (166). La disparité des données obtenues principalement sur les DC semble indiquer un effet de la voie LXR sur l'inflammation, dépendante du modèle et des circonstances expérimentales (discuté ref (167)).

La régulation de l'expression des gènes codants pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire a été démontrée comme impliquant plusieurs mécanismes (illustré Ch I.I.7). Dans des macrophages murins, il a été observé que les facteurs inflammatoires (IL-6, COX2, IL-12p40, IP10, TNFα, INOS et IL-1Rα), réprimés par LXR durant une stimulation TLR3 ou TLR4, ne présentaient pas de motif LXRE dans leur séquence promotrice mais des sites de fixation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1, suggérant un mécanisme de transrépression (160). Des macrophages de souris invalidées pour NCoR ou SMRT ont montré une perte de l'effet inhibiteur des LXR, validant l'implication d'un mécanisme de transrépression impliquant ces corépresseurs (83).

L'inhibition de la signalisation par STAT1 (induite par l'IFNγ) dans les astrocytes et macrophages, a également été démontrée comme dépendante de LXR *via* la fixation de LXR-SUMOylé sur STAT1 phosphorylé, empêchant la fixation du facteur de transcription au site promoteur cible (77,168).

Dans des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (en présence de GM-CSF), l'activation de LXR entraînait une diminution de l'expression de la sous-unité p50 de NF-κB et de la phosphorylation de la sous-unité p65 induite par TLR4. Une inhibition de la translocation nucléaire de la sous unité p50 était observée sans effet sur celle de p65 (80).

Récemment, un mécanisme de répression de l'inflammation par la voie LXR a été mis en évidence dans des macrophages murins comme dépendant de l'induction d'ABCA1. L'activation des LXR entraînait un appauvrissement de la membrane cellulaire en cholestérol *via* ABCA1, inhibant le recrutement de MyD88 et TRAF6 vers les radeaux lipidiques, la phosphorylation des protéines de signalisation ERK, p38 et JNK, ainsi que la translocation nucléaire de la sous-unité p65 de NF-κB,

induite par la stimulation TLR2 et TLR9 des macrophages (169). L'invalidation génique d'*abca1* et *abcg1* avait précédemment été démontrée dans des macrophages murins comme augmentant la réponse inflammatoire aux TLR2, 3, 4, 7 et 9. Ces effets étaient accompagnés par une augmentation de l'expression membranaire du complexe TLR4/MD2, et de la sécrétion des cytokines TNFα, IL-6, IL-1β et IL-12p70 (170).

Ainsi, la régulation des réponses inflammatoires par les LXR est dépendante du modèle cellulaire étudié, et fait intervenir plusieurs mécanismes impliquant les LXR directement ou la modification de l'homéostasie du cholestérol par les LXR.

ii. Impact de l'inflammation sur la voie des Liver X Receptors

A l'opposé, plusieurs études montrent un effet inhibiteur des réponses inflammatoires sur des composantes spécifiques de la voie des LXR. Ainsi il a été observé que le prétraitement de macrophages murins (dérivés de cellules de moelle osseuse, en présence de milieu conditionné par des cellules entéroendocrines « L-cells » comme source de M-CSF pendant 6-9 jours) avec de l'IFNγ (18h), suivi de l'agoniste LXR T091317 (24h), diminuait l'induction de *abca1, srebp1c* et *aim* (3 gènes cibles de LXR). Cet effet n'était cependant pas décrit pour les gènes *mertk, idol* et *abcg1*, illustrant une régulation différente de ces gènes (168). De manière similaire, le traitement par des ligands TLR3 ou TLR4 (respectivement poly(I:C) et Lipid A) de macrophages murins péritonéaux, ainsi que de cellules HEK-293 transfectées, montraient une inhibition de l'induction d'*abca1*, *apoe, srebp1c* et *fasn*, par un traitement simultané avec des agonistes LXR. Ce mécanisme a été identifié comme dépendant de l'induction d'IRF3 par ces TLR, indépendamment de la voie MyD88 et NF-κB. De manière intéressante, une inhibition de l'expression de la protéine iNOS était également observée, montrant une régulation croisée entre la transcription induite par les TLR et la voie LXR (171). Cet équilibre peut être influencé de manière dépendante du contexte, comme c'est le cas dans des plaques, montrant une surexpression de TLR4 à la surface des cellules. Cet effet a été reproduit *in vitro* par traitement avec des LDL oxydés de macrophages humains dérivés de monocytes (172).

Ces différentes études démontrent donc une régulation croisée entre les réponses inflammatoires (médiées par les ligands des TLR et les cytokines) et la voie LXR, dépendantes du contexte et des gènes cibles considérés.

V. Les *Liver X Receptors* dans les hémopathies malignes (et autres cancers)

Depuis plusieurs décennies, il un lien a été observé entre la carcinogenèse et l'accumulation cellulaire de cholestérol (118). Dans le cancer du sein, il a été observé une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses et de l'angiogenèse tumorale. De plus, le taux de cholestérol plasmatique durant la progression tumorale, mais non l'initiation, était abaissé alors que les cellules tumorales sur-exprimaient les récepteurs aux lipoprotéines LDLR et SR-B1. Ces données suggèrent une surconsommation du cholestérol par les cellules cancéreuses (173). Une augmentation de la prolifération induite par le cholestérol a également été démontrée avec des cellules de cancer du côlon. Cette dernière était associée à la phosphorylation de Akt et l'augmentation de la transcription du facteur Jun (174). Dans plusieurs études menées avec des cellules de leucémie aiguë myéloïde ou leucémie myéloïde chronique (LAM et LMC respectivement), il a été observé :
une augmentation de l'activité et de l'expression du récepteur LDLR (175) ;

une diminution de la dégradation des LDLR par boucle de rétrocontrôle et l'accumulation du cholestérol (que nous savons aujourd'hui induite par les LXR) (176) ;

une augmentation de l'activité et de l'expression de l'enzyme HMGCR, (enzyme clef de la biosynthèse du cholestérol) (175) ;

ainsi qu'une diminution de la synthèse hépatique d'acide biliaire chez les patients souffrant de LAM, voie nécessaire à l'élimination de l'excès de cholestérol dans l'organisme (177).

De manière intéressante, il a été observé dans des cellules de LAM une diminution de la sensibilité aux chimiothérapies due à un excès de cholestérol, l'utilisation de statine (inhibiteur de la HMGCR) augmentait la chimiosensibilité des cellules en diminuant le cholestérol intracellulaire (178,179). De plus, il a été observé que des cellules chimiorésistantes montraient une augmentation de l'internalisation de LDL et de l'expression de HMGCR (180). La modulation du cholestérol intracellulaire dans les cellules malignes a été étudiée comme approche thérapeutique dans divers cancers (110,181–184). Ceci est illustré par une méta-analyse récente démontrant une diminution de la mortalité liée au cancer par les statines (185).

Ces données semblent indiquer un effet thérapeutique de la déprivation en cholestérol des cellules malignes. Comme détaillé ci-dessus, l'activation de la voie LXR conduit à une diminution du cholestérol intracellulaire *via* une réduction de l'entrée du cholestérol, une répression de sa biosynthèse et une augmentation de son efflux (Ch 1.III). Il a été confirmé sur plusieurs types de cancer un effet anti-prolifératif et anti-tumoral des agonistes LXR (Tableau 3) (186).

Tableau 3 - Traitement par agonistes LXR dans les cancers

Cancer	Expression des LXR	Combinaison	Références
Prostate	LXRα & β	/	(187,188)
Sein	LXRα & β	/	(189–192)
Ovaire	LXRα & β	/	(193)
Peau (mélanome)	LXRβ	Decarbazine et vemurafenib	(194,195)
Pancréas	LXRβ	Gemcitabine	(196)
Cerveau (Glioblastome)	?	/	(197,198)
Sang (LAM, LLC, MM)	LXRα & β	Bexarotène	(199–201)
Poumon	LXRα & β	/	(162)
Colon	LXRα & β	/	(202–204)

Abréviations : LAM : leucémie aiguë myéloïde, LLC : Leucémie Lymphoïde chronique, MM : Myélome multiple). (Adapté de la référence (186))

1. Les *Liver X Receptors* et mort cellulaire

Les études référencées dans le tableau 3 (ci-dessus) permettent de révéler des mécanismes complémentaires de l'effet thérapeutique de la voie LXR.

Dans des cellules de glioblastome, il a été observé que l'induction de l'efflux du cholestérol par stimulation de la voie LXR diminuait la quantité de radeaux lipidiques, inhibant la phosphorylation d'Akt, conduisant à la mort cellulaire (198).

Dans des cellules de mélanome, l'induction de la mort cellulaire par les agonistes LXR a été observée comme dépendante de l'activation de la caspase-3 (194). De plus, une augmentation de l'expression de BAX dans des cellules du cancer de l'ovaire démontrait la contribution de la voie d'apoptose intrinsèque (193). Une étude réalisée sur des cellules de cancer colorectal humaines confirmait une apoptose impliquant l'activation des caspases, inductible par la surexpression de LXRα (203). Une augmentation de l'apoptose par l'activation des LXR a également été démontrée dans des cellules de leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B), avec une diminution de l'expression de la protéine protectrice BCL-2 (200). La contribution de la mort cellulaire induite par la caspase-1 (conduisant à

une mort cellulaire inflammatoire : la pyropsose) a également été démontrée dans des cellules de cancer colorectal, impliquant une activité non transcriptionnelle de LXRβ (204). Ces études montrent donc un effet direct de l'activation de la voie LXR sur les cellules tumorales.

De manière intéressante, une cytotoxicité spécifique des cellules cancéreuses induite par l'activation des LXR a été observée. Cet effet différenciel a été démontré sur des cellules leucémiques T (Jurkat et Molt4) et lymphoblastiques B (EB-3), pour lesquelles la stimulation de la voie LXR induisait la mort des cellules cancéreuses sans affecter les cellules normales. Ce mécanisme a été démontré comme dépendant de l'isoforme LXRα suggérant que la surexpression de cet isoforme pourrait être un élément de bon pronostic dans cette pathologie. La stimulation de cette voie LXR montrait une diminution de l'expression de BCL2 (facteur anti-apoptotique), ainsi qu'une augmentation de la protéine pro-apoptotique Par-4 (205). Cette étude est encourageante pour le développement d'agoniste LXR pour l'élimination de cellules tumorales.

2. Régulation du cycle cellulaire par les *Liver X Receptors*

Les agonistes LXR peuvent également contribuer à la régulation du cycle cellulaire. Dans l'étude citée ci-dessus s'intéressant aux cellules leucémiques T et lymphoblastiques B, il a été observé que la stimulation de la voie LXR réprimait les protéines contribuant au passage en phase S du cycle cellulaire (c-Myc, E2F-1 et AAT). Dans des cellules de cancer du sein, un traitement par agoniste LXR entraînait une diminution de la prolifération cellulaire associée avec une rétention en phase G0-G1 du cycle cellulaire. Il a été observé une diminution de l'expression des protéines KP2, cycline A2 et cycline D1 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Une augmentation de p53 et une diminution de la phosphorylation de Rb étaient également observées (190). Un arrêt du cycle cellulaire en G0-G1 induit par activation de la voie LXR a également été identifié dans des cellules de cancer du pancréas comme faisant intervenir la diminution de SKP2 conduisant à une réduction de la dégradation de p27Kip1 (187). L'implication de la régulation des membres de la famille E2 a également été observée dans des cellules du cancer du sein, avec une répression de la transcription de E2F2 par les agonistes LXR, bloquant le cycle cellulaire (189).

3. *Liver X Receptors* dans les cellules somatiques : régulation indirecte de la croissance tumorale

Bien que les agonistes LXR inhibent la prolifération et la viabilité de nombreuses cellules malignes (comme développé ci-dessus), une étude a démontré que le traitement *in vitro* de cellules de mélanome par ces agonistes LXR n'affectait aucun de ces caractères, malgré une expression basale

de LXRβ. Au contraire, les agonistes LXR montraient une forte activité antitumorale sur les mêmes cellules *in vivo.* Cette différence a été expliquée par l'induction d'ApoE par activation de la voie LXR dans les cellules malignes et de l'environnement tumoral. Cette apoliprotéine agit sur les cellules de mélanome en inhibant leur capacité de prolifération (par interaction avec le récepteur LRP1), et agit sur les cellules endothéliales en inhibant leur recrutement (*via* interaction avec le récepteur LRP8), (195). Ceci suggère un effet de la stimulation de la voie LXR dans l'environnement tumoral, permettant une régulation indirecte de la croissance tumorale.

VI. Utilisation clinique des agonistes *Liver X Receptors* : espoirs et limitations

La modulation pharmacologique de l'activation des LXR a démontré un grand intérêt thérapeutique dans plusieurs pathologies métaboliques, inflammatoires et malignes. Bien que les premiers agonistes des LXR aient montré des effets délétères (augmentation sérique et hépatique des triglycérides, stéatose hépatique (206)) limitant leur utilisation clinique, le développement continu et ciblé de nouvelles molécules permet de favoriser les effets thérapeutiques tout en limitant les effets secondaires néfastes (206,207).

Dès le début des années 2000, deux agonistes synthétiques pan-LXR (stimulant LXRα et LXRβ) ont été développés. Il s'agit de T0901317 et GW3965 (208,209). Malgré un effet thérapeutique probant dans l'athérosclérose, il a été observé une stimulation de la lipogenèse hépatique par la voie des SREBPs, conduisant à une augmentation du taux de triglycérides et de VLDL plasmatiques, ainsi qu'à une stéatose hépatique (208,210). Plusieurs approches ont alors été envisagées pour limiter ces effets, reposant notamment sur l'expression préférentielle des isoformes de LXR.

L'isoforme LXRα est prédominant dans le foie et a été décrit comme impliqué dans la lipogenèse hépatique délétère, à l'aide d'un modèle murin invalidé pour *lxrα* (211). Les recherches se sont donc tournées vers le développement d'agonistes spécifiques de l'isoforme ubiquitaire LXRβ. Cette approche était encouragée par l'étude du modèle murin invalidé pour *lxrα*, montrant une forte activité anti-athérosclérose de LXRβ (212). Bien qu'il existe une grande similarité du domaine de liaison aux ligands des deux isoformes de LXR (213,214), le développement de plusieurs composés comme ceux dérivés du tetrahydro-cyclopenta[b]indoles, pourrait s'avérer intéressant. Ces composés montrent une activation prépondérante de LXRβ, avec une augmentation du taux de HDL circulants (anti-athérosclérotique), sans modifier le taux de triglycérides plasmatiques (215).

Une autre approche a été le développement d'antagonistes des LXR hépatiques. Il a été observé dans un modèle murin de diabète de type 2 que l'invalidation des deux isoformes de LXR permettait une restauration de la sensibilité à l'insuline, ainsi qu'une diminution de la lipogenèse et de la stéatose hépatique. Ces souris conservaient cependant une lipogenèse active au sein des tissus adipeux associée à une accumulation des graisses (216). Paradoxalement, le traitement de souris obèses avec des agonistes LXR favorise également une meilleure tolérance au glucose, limitant la glycogenèse hépatique et augmentant la prise en charge du glucose par les adipocytes. Cependant, cet effet bénéfique est limité par la toxicité hépatique des agonistes LXR (217). La synthèse d'un agoniste inverse des LXR (SR9238) distribué principalement au niveau hépatique, et en second lieu au niveau

intestinal (dégradé par les lipases plasmatiques), permet d'inhiber la lipogenèse et prévient la stéatose hépatique (217).

Le développement de modulateurs des voies LXR spécifiques de tissus est très étudié. Ainsi, un agoniste stéroïdien synthétique (ATI-829) a démontré une activation de la voie LXR au niveau intestinal et dans les macrophages, mais n'augmentait pas l'expression hépatique des gènes cibles de LXR (dont *fasn* et *srebp1c* impliqués dans la lipogenèse). Ceci se traduisait par une prévention de l'athérosclérose dans un modèle de souris LDLR KO, sans augmenter le taux de triglycérides et de VLDL plasmatiques (218). Une étude récente a proposé la possibilité d'une activation ciblée des LXR, spécifique d'un tissu, par l'utilisation d'un agoniste conjugué à un anticorps monoclonal de ciblage. Dans cette étude, un agoniste LXR était conjugué à un anticorps anti-CD11c permettant une activation spécifique de la voie LXR dans les cDC, les monocytes et les macrophages humains sans stimulation dans les hépatocytes (219). Cette stratégie prometteuse pourrait permettre de promouvoir l'effet anti-inflammatoire ou anti-cancer des agonistes LXR sans induire la lipogenèse hépatique.

Etant donné le caractère permissif de l'hétérodimère RXR/LXR, une autre approche utilisant un agoniste de RXR permettant d'induire l'activité transcriptionnelle des LXR a été évaluée. L'utilisation de Bexarotène (agoniste RXR) dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, permettant l'activation de la voie LXR, induit la production d'ApoE conduisant à la diminution des plaques amyloïdes (220). Cette approche est des plus intéressante car le bexarotène est approuvé par l'administration américaine (FDA pour *Food and Drug Administration*) pour son utilisation par administration orale dans le traitement de lymphomes cutanés T (221). L'utilisation de cet agoniste n'a cependant révélé qu'une reproduction partielle de l'effet des agonistes LXR, nécessitant dans certain cas une association avec un agoniste LXR (199).

L'induction spécifique de la fonction de transrépression de la voie LXR a pu être réalisée par un agoniste synthétique de haute affinité pour LXRβ : le GSK9772. Ce dernier montrait une diminution de la sécrétion de cytokines inflammatoires induite par les LXR SUMOylés, sans augmentation du taux de triglycérides plasmatiques (222).

Les approches permettant une optimisation des effets thérapeutiques des modulateurs de LXR sont variées et prometteuses. Cependant, elles sont encore restreintes pour la plupart à des études précliniques. Il existe une différence génétique entre l'homme et la souris concernant la voie des LXR. Par exemple, les promoteurs des gènes *cetp* (223), *lxra* (224) et *tlr4* (163) ne sont pas sous la dépendance des LXR chez la souris contrairement à l'homme. Les modèles précliniques ne sont de ce

fait que partiellement relevants pour l'homme, bien que leur utilisation reste nécessaire avant l'utilisation des molécules dans les études cliniques.

1. *Les* agonistes des *Liver X Receptors* dans les études cliniques

Le premier agoniste LXR à avoir été testé chez l'homme est le LXR-623. Ce dernier montrait des résultats encourageants avec l'induction des molécules d'efflux du cholestérol ABCA1 et ABCG1 sur les cellules sanguines d'individus sains, et une lipogenèse hépatique n'apparaissant qu'à forte concentration. Cependant, des évènements neurologiques imprévus (et encore inexpliqués) ont conduit à l'arrêt de l'étude. A l'heure actuelle, aucun évènement de cette nature n'a été publié pour les autres agonistes testés, et l'implication de la stimulation de la voie LXR dans ces complications n'a pas pu être démontrée. D'autres composés ayant fait l'objet d'un essai clinique de phase 1 ont montré des succès limités avec un arrêt des études pour des raisons souvent non mentionnées. A l'heure actuelle, l'acide hyodéoxycholique développé par le laboratoire « AtheroNova » dans le traitement de l'hypercholestérolémie est activement engagé dans une étude clinique (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01931241), (Tableau 4).

Tableau 4 - Agonistes LXR couramment utilisés comme outil d'étude ou ayant fait l'objet d'une étude clinique.

Composé	Laboratoire	Avancement de l'étude	Références
T0901317 **(N-(2,2,2-trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)-ethyl] phenyl]-benzenesulfonamide)**	• **Tularik (maintenant Amgen)**	• Premier agoniste des LXR décrit. • Utilisé comme outil d'étude mécanistique.	(208)
GW3965 **(3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl) amino]propyloxy] phenylacetic acid hydrochloride)**	• **GlaxoSmithKline**	• Inhibe l'atherosclerose dans des modèles murins. • Diminution du taux plasmatiques de VLDL-C et LDL-C et augmentation de HDL-C.	(209,225)
LXR-623	• **Wyeth Pharmaceuticals (maintenant Pfizer)**	• Phase I (2006-2007). • Projet terminé pour des raisons non divulguées.	ClinicalTrials.gov : NCT00379860 ; (226,227)
CS-8080	• **Daichii Sankyo**	• Phase I (2008-2015) • Projet terminé pour des raisons non divulguées.	ClinicalTrials.gov : NCT00796575
BMS-779788 (aussi nommé XL-652)	• **Exelixis et Bristol-Myers Squibb**	• Phase I (2009-2011). • Complétée.	ClinicalTrials.gov : NCT00836602
BMS-852927 (aussi nommé XL-041)	• **Exelixis et Bristol-Myers Squibb**	• Phase I (2012-2013) (patients souffrant d'hypercholesterolémie, traités avec des statines). • Projet terminé.	ClinicalTrials.gov : NCT01651273
Acide Hyodeoxycholique (Dérivé d'acide biliaire)	• **AtheroNova**	• Phase I (2013-…). • En cours.	ClinicalTrials.gov : NCT01931241 (228)

Abréviations : VLDL-C : *Very Low Density Lipoprotein Cholesterol,* LDL-C : *Low Density Lipoprotein Cholesterol.* Adapté de la référence (206)

Chapitre II. Les Cellules Dendritiques Plasmocytoïdes Humaines

I. Généralités

1. Bref Historique

Figure 10 - Les Prix Nobels de Physiologie et Médecine 2011
Ralph M. Steinmann (Gauche) « Pour sa contribution à la découverte des cellules dendritiques et leurs rôles dans l'immunité adaptative », Jules A. Hoffmann (droite) & Bruce A. Butler (centre) « Pour leurs découvertes concernant l'activation de l'immunité innée ».

En 1958, O.A. Trowell conclut que les lymphocytes ne pouvaient pas initier une réponse immunitaire efficace sans une cellule tierce (229). Ce n'est qu'en 1967 que Mosier et son équipe démontrèrent que ce type de cellule pouvait être retrouvé parmi la fraction des cellules adhérentes de la rate. Lors d'une expérience *in vitro*, l'ajout d'antigènes (érythrocytes de mouton) à cette fraction cellulaire permettait leur phagocytose et l'induction d'une forte production d'anticorps par les lymphocytes en suspension (230). La reproduction de cette expérience a permis de démontrer qu'après incubation avec l'antigène pendant 1 à 4 heures, une partie des cellules adhérentes se décollaient pour former des clusters avec les lymphocytes en suspension. De plus, l'hémagglutination des érythrocytes ovins se produisait au niveau de ces regroupements cellulaires. En 1973, lors d'une conférence à Leiden, Ralph Steinman présentait un nouveau type de cellules, observées dans des cultures de splénocytes murins. Il décrivit ces cellules comme représentant une faible fraction des cellules adhérentes spléniques (<1%), ayant une capacité de phagocytose inférieure à celle des autres cellules adhérentes, présentant une forme irrégulière et la capacité de se décoller du support de culture. Ces cellules furent alors nommées cellules dendritiques ou DC (*dendritic cells*) (231).

Dès lors, le développement des connaissances et des techniques relatives aux DC (protocoles de purification et anticorps cytotoxiques) ont permis de valider le caractère indispensable de ces cellules à l'activation lymphocytaire T et B (232,233). Ces avancées techniques ont également permis de révéler chez la souris :

l'implication des DC du donneur dans le rejet de greffe (234) ; l'implication des DC dans la réponse antitumorale (235) ; ainsi que leurs implications dans plusieurs actions de modulation de la réponse immunitaire (236).

2. Sous-populations de cellules dendritiques

Les fonctions des DC ont été démontrées comme multiples et dépendantes de leur environnement (dont les conditions inflammatoires et partenaires cellulaires) et de la sous-population de DC étudiée. Cette classification en sous-populations est déterminée par leur origine cellulaire, leur localisation, leur modalité de migration, ainsi que leur phénotype et leurs fonctions immunologiques spécifiques.

Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons principalement aux sous-populations de DC humaines.

i. Classification

Du fait de leur accessibilité, la majorité des connaissances des DC humaines provient d'études sur la peau et le sang.

Les DC humaines sont caractérisées par leur forte expression des molécules de CMH de classe II (dont HLA-DR) et l'absence de marqueurs de lignée spécifiques (dont CD3 pour les LT, CD19 pour les LB, CD14 pour les Monocytes, CD66b pour les Granulocytes) (237).

Les DC du sang ont été classées en 3 principales sous-populations : 2 sous-populations de DC dites myéloïdes aussi appelées conventionnelles (cDC) caractérisées par l'expression des marqueurs CD1c/BDCA-1 (cDC1) et CD141/BDCA-3 (cDC2) et une population de DC plasmocytoïdes (PDC), qui sont caractérisées par l'expression de CD123, BDCA2 et BDCA4 (Figure 11).

Des études menées sur les cellules cutanées ont permis l'identification d'une première population de DC interstitielles de l'épiderme : les cellules de Langerhans (LC) CD1a/EpCAM/langerin/E-cadherin (238). Deux populations de DC du derme ont été caractérisées par l'expression du marqueur CD1a et CD14. Bien qu'historiquement le marqueur CD14 soit caractéristique des macrophages (Mρ) et des monocytes, la capacité de migration spontanée des cellules du derme depuis les explants a permis leur classification en DC (239,240). L'analyse par cytométrie en flux des cellules provenant de différents tissus (foie, poumon, peau) a révélé la présence des DC $CD1c^+$ et CD141+ (initialement identifiées dans le sang). Les DC CD14+ quant à elles n'ont pas été identifiées dans le sang. L'étude transcriptomique de ces différentes DC ($CD1c^+$ et $CD141^+$) suggèrent que les DC du sang pourraient être les précurseurs des DC tissulaires (241).

Une autre population de DC a été récemment identifiée dans les sites inflammatoires, appelée de ce fait, DC inflammatoire (infDC) (242,243). Ces infDC ont été décrites chez l'homme dans plusieurs pathologies inflammatoires telles que la dermatite atopique, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde (PR), et dans les ascites tumorales. Elles expriment les marqueurs HLA-DR, CD11c, BDCA1, CD1a, FcεRI, CD206, CD172a, CD14 et CD11b, ainsi que le récepteur au M-CSF. Une étude des infDC issues des ascites tumorales a révélé qu'elles partageaient une signature transcriptomique commune avec les DC générées *in vitro* à partir de monocytes (moDC), suggérant une différenciation non pas à partir du progéniteur commun au DC, mais à partir des monocytes (244). Cependant, il a été observé que des infDC issues du liquide synovial de patients souffrant de PR pouvaient induire une différenciation *ex vivo* des lymphocytes T CD4 naïfs vers le profil Th17 (244). Au contraire, l'utilisation de moDC comme modèle de infDC de l'épiderme (IDEC : première observation d'une population de infDC (245)) induisait une différenciation vers le profil Th1 (246). L'induction d'une différenciation vers le profil Th17 a également été observée *ex vivo* pour des infDC issues d' ascite tumoraux (244). Il semblerait donc que les infDC soient semblables aux moDC, et que ces cellules présentent la capacité d'induire la différenciation de lymphocytes T CD4 naïfs vers les profils inflammatoires Th1 et Th17 (243).

La classification historique des DC tend à les distinguer selon la lignée hématopoïétique à partir de laquelle elles sont différenciées à savoir : « myéloïdes » ou « lymphoïdes ». Alors que les cDC (au sens large, incluant les DC résidentes) sont considérées comme appartenant à la lignée myéloïde, les PDC ont été considérées comme appartenant à la lignée lymphoïde. Cependant, cette distinction est fortement remise en question (247–249).

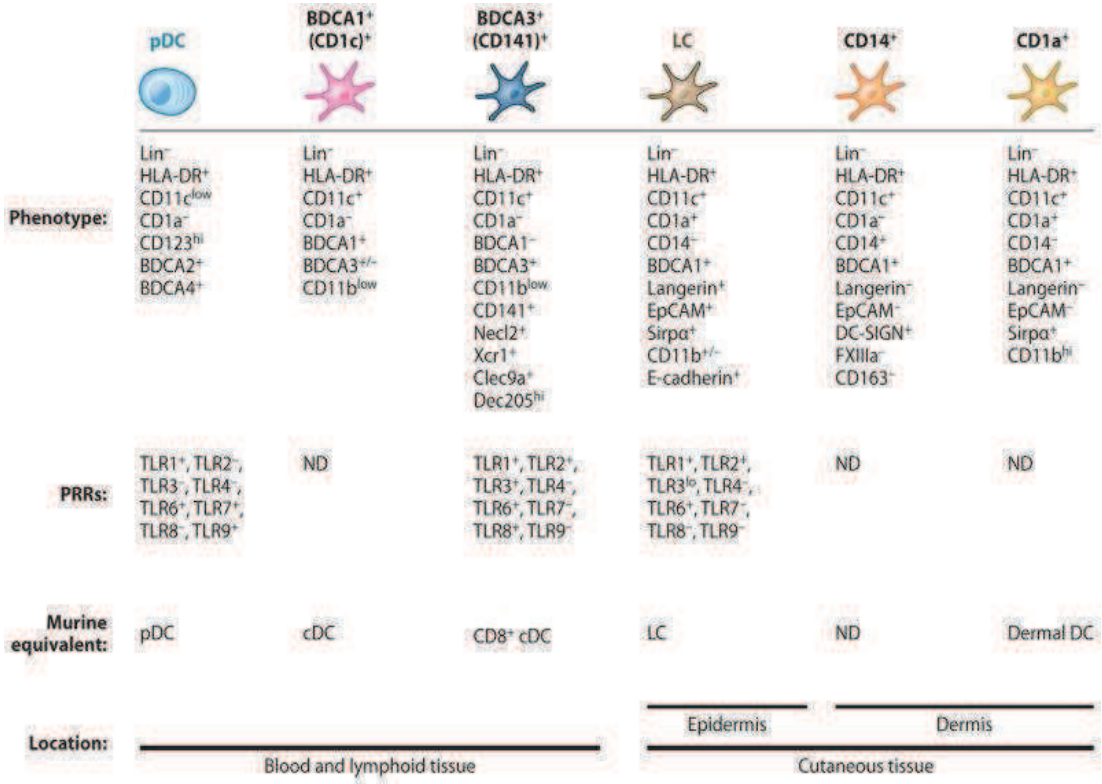


Figure 11 - Sous-types de cellules dendritiques humaines « classiques » et leurs équivalents murins.
Sont précisés le phénotype, l'expression des récepteurs PRR (*Pathogen Recognition Receptor)* et plus particulièrement les TLR (*Toll Like Receptors*), ainsi que leur localisation cellulaire.
Abréviations : pDC (*plasmacytoid dendritic cells) ;* LC (*Langerhans Cells) :* Cellules de Langerhans ; cDC (*conventional Dendritic Cells) :* Cellules Dendritic Conventionelles. Adapté des références (250),(251)

ii. Ontogénie des cellules dendritiques

Les DC forment une famille hétérogène de cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques (CSH) CD34. Selon le modèle classique, les CSH sont des cellules multipotentes capables d'auto-renouvèlement et de différenciation en progéniteurs spécifiques de lignées tels que les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP pour *common lymphoid progenitors*) ou progéniteurs myéloïdes communs (CMP pour *common myeloid progenitors*). Alors que les CLP sont à l'origine principalement des lymphocytes T, B et NK, les CMP se différencient en progéniteurs et précurseurs des autres cellules sanguines (ME-P : plaquettes et érythrocytes ; Ba-P et Eo-P : les polynucléaires/granulocytes basophiles et éosinophiles ; GMP : polynucléaires/granulocytes neutrophiles, monocytes) (252).

Concernant les DC, une étude sur des progéniteurs hématopoïétiques humains montrait que des PDC et des DC CD11c+ (« myéloïdes ») pouvaient toutes deux être générées à partir des progéniteurs myéloïdes et lymphoides (247). Un autre modèle impliquant le progéniteur des granulocytes et macrophages (GMP) et un progéniteur multilymphoïde MLP (pouvant se différencier en lymphocytes B, T, NK ainsi que monocytes) montrait la capacité commune de ces deux progéniteurs à se

différencier en DC $CD14^{-}CD11c^{+}CD1a^{+}$ (cDC1) (253). Le fait que ces MLP aient également la capacité de se différencier en Mρ, suggére un potentiel de progéniteur commun aux macrophages et DC préalablement décrit chez la souris (254). Un progéniteur commun des DC (CDP) a également été décrit chez la souris (250,255,256). Il a été observé que des progéniteurs CMP et CLP humains pouvaient se différencier en PDC et cDC *in vivo* chez la souris, montrant des profils phénotypiques et transcriptomiques identiques pour les deux progéniteurs (248). Plus récemment, un homologue humain a été identifié comme issu d'un progéniteur de granulocyte-monocyte-DC (GMP), se différenciant en un progéniteur plus restreint aux monocytes-DC (MDP), qui génère des monocytes ainsi qu'un progéniteur aux DC (CDP), capable de produire les 3 principaux sous-types de DC à savoir : les PDC, cDC CD141+ et cDC CD1c+ (249). Toutes ces études démontrent que la dichotomie lymphoïde/myéloïde n'est plus d'actualité, et la plasticité des progéniteurs hématopoïétiques à se différencier en toutes les sous-populations de DC.

Différents facteurs de croissance comme CSF-1, FLT3L, et GM-CSF ont été montrés comme nécessaires à la différenciation des DC. L'injection de FLT3L à des patients a démontré une augmentation du nombre de PDC et cDC circulantes (257–259). De plus, les DC humaines (cDC $CD141^{+}$, cDC $CD1c^{+}$ et PDC) expriment le récepteur FLT3 ainsi que le récepteur au GM-CSF, et la génération *in vitro* de cDC $CD141^{+}$ requiert ces deux cytokines (241,260,261). Un déficit immunitaire ciblant les DC, les monocytes, les lymphocytes B et les NK (DCML) a été caractérisé par une perte complète des DC circulantes et dermiques, une perte des progéniteurs médullaires GMP et MLP, ainsi qu'un taux élevé de FLT3L circulant (262). Ces données soutiennent le modèle d'une différenciation des DC à partir des GMP et MLP (253). Ce déficit immunitaire est associé à des mutations des gènes codants pour les facteurs de transcription GATA2 et IRF8 (263,264). Alors que la mutation de *gata2* affecte plusieurs lignées hématopoïétiques, il est intéressant de noter que les mutations de *irf8* affectent principalement les DC et les monocytes (perte totale des cDCs et des PDC circulantes avec une diminution des monocytes pour la mutation K108E et une perte spécifique des cDC CD1c+ pour la mutation T80A) suggérant une implication plus précoce de GATA2 dans l'hématopoïèse (264). De manière intéressante, les LC et Mρ épidermiques ne semblent pas affectées, suggérant une voie de différenciation distincte de ces deux types cellulaires (Figure 12).

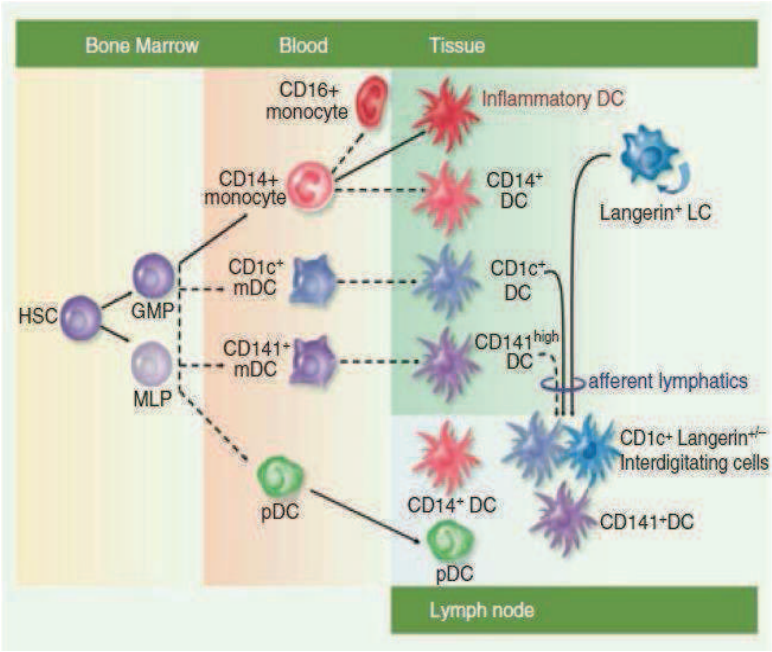


Figure 12 - Modèle de différenciation et distribution des DC humaines.
Abréviations : HSC, *Hematopoietic stem cells* ; GMP, *Granulocyte-Macrophage Progenitor* ; MLP, *Multi-Lymphoid Progenitor* ; mDC, *myeloid Dendritic Cells* ; pDC, plasmacytoid Dendritic Cells ; DC, *Dendritic cells* ; LC, *Langerhans cells*. Adapté de la référence (265)

D'autres facteurs de transcription sont importants à la régulation de la différenciation DC. Des expériences de différenciation *in vitro* de DC ont révélé une implication des facteurs de transcription IRF4 et BATF3 pour les DC CD141$^+$ (260,266). Bien que le facteur IKAROS ait été décrit chez la souris comme impliqué dans la différenciation des PDC (267), une mutation du gène codant pour ce facteur chez l'homme a été observée comme causant une pancytopénie, semblant l'impliquer de manière plus large dans la régulation de l'hématopoïèse (268). Ce paragraphe démontre que les facteurs de croissance et les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des DC humaines sont de mieux en mieux connus.

iii. Facteurs de différenciation des cellules dendritiques plasmocytoïdes

Une voie de différenciation spécifique des PDC a été démontrée comme impliquant les facteurs de trancription ID2 et ID3. Leur surexpression dans des progéniteurs CD34+ humains conduit à une inhibition de la différenciation lymphocytaire T, B et PDC, sans modifier la différenciation *in vitro* des DC CD14+ (269). Au contraire, l'inhibition de ces facteurs de transcription empêche la différenciation en DC CD1a+ (270). L'analyse de PBMC de patients souffrant du syndrome de Pitt-Hopkins (présentant une mutation perte de fonction mono-allélique du facteur de transcription E2-2) révèle une modification du phénotype des PDC, ainsi qu'une forte diminution de la capacité de sécrétion d'IFN-α après stimulation par des motifs CpG déméthylés. L'invalidation hétérozygote du gène codant pour E2-2 a permis de confirmer ce résultat chez la souris, tandis qu'une invalidation

totale inhibait la maturation PDC (271). Il a ainsi été observé que l'invalidation de E2-2 dans des PDC murines procurait à ces cellules des caractéristiques propres aux cDC avec une perte des marqueurs spécifiques de PDC, une acquisition du CD8, une morphologie de cDC et l'acquisition de la capacité à activer des lymphocytes TCD4 de manière comparable aux cDC (272). Il est important de noter que le facteur de transcription E2-2 contrôle l'expression d'IRF8 et est antagonisé par ID2, deux facteurs préalablement impliqués dans la différenciation des PDC (273). Ainsi, la différenciation PDC nécessite l'implication de plusieurs facteurs de transcription.

II. Les cellules dendritiques plasmocytoïdes humaines

Dans les années 1980-1990, plusieurs études ont fait référence à une population minoritaire de leucocytes présentant la caractéristique de produire de grandes quantités d'IFN de type I après stimulation par des dérivés viraux. Ces cellules ont alors été nommées « *Interferon producing cells* » (IPC), ou encore *« natural IFN-alpha producing cells »* (NPC) (274). Elles n'exprimaient par les marqueurs de la lignée myéloïde (CD33, CD13, CD11b, CD15 ou CD14), ni les marqueurs lymphocytaires T (CD3), B (CD19) ou T précoce (CD7), mais exprimaient la molécule de CMH II, HLA-DR (275,276). Cependant, elles se distinguaient des DC du sang périphérique qui adhéraient au support de culture (277). Indépendamment de ces observations mais en se basant sur l'observation de Lennert et Remmele d'une population cellulaire des ganglions dénommée alors "*T associated plasma cells*" ou "*plasmacytoid T cells*" (278), Facchetti et son équipe caractérisaient une population de cellules plasmocytoïdes monocytaires s'accumulant aux sites inflammatoires et dans les nœuds lymphatiques (279,280). En 1997, il a été démontré que ces mêmes cellules avaient la capacité de générer *in vitro* des DC en présence d'IL-3 et CD40L leur valant la dénomination de pré-DC2 (281) ; puis deux ans plus tard, que ces pré-DC2 et les cellules productrices d'interféron préalablement décrites correspondaient à un même type de cellules : les PDC (282,283).

1. Migration et localisation

Les PDC sont des cellules qui se différencient intégralement dans la moelle osseuse. Elles passent alors dans le sang, où elles représentent de 0,3 à 0,8% des cellules mononucléées, et 45 à 50% des DC circulantes à l'état basal (251). Chez l'Homme, cette migration peut être stimulée par l'action des facteurs de croissance FLT3L et GM-CSF (284). Les PDC peuvent alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques, amygdales, rate et plaques de Peyer) et primaires (Thymus) (247,285,286). Elles sont également retrouvées dans les tissus périphériques dans des conditions inflammatoires (287–289). Contrairement aux cDC, les PDC ont été décrites comme entrant dans les organes lymphoïdes secondaires par les capillaires sanguins, plutôt que la voie lymphatique (290). Cette observation est confortée par l'absence de PDC dans les vaisseaux lymphatiques afférents chez le rat (291). Dès leur identification, les PDC ont été observées comme localisées dans les nœuds lymphatiques à proximité des cellules endothéliales spécialisées ou HEV (*High Endothelial Veinule*), ainsi que dans les zones extrafolliculaires T (278,282).

A côté de cette localisation différentielle, il a été identifié que l'interaction des PDC avec l'endothélium impliquait les molécules d'adhérence L-sélectine (CD62L) et E-sélectine (CD62E), lors du processus initial de « *rolling* », ainsi que les intégrines β1 et β2 pour l'attachement ferme à

l'endothélium. Ce recrutement implique le récepteur CCR5 (292,293). Cependant, une étude *in vitro* des PDC humaines n'a démontré qu'une faible migration induite par CCL5 (ligand de CCR5).

Au contraire, la chimiokine CXCL12 (aussi appelée SDF-1, ligand de CXCR4) induisait une forte migration des PDC humaines en synergie avec le ligand de CXCR3 (294). Une colocalisation des cellules exprimant IP-10 et Mig (ligands de CXCR3), ainsi que CXCL12 et les PDC, a été observée avec la présence de PDC dans les vaisseaux sanguins de la zone T des ganglions et dans l'épithélium inflammé (294).

Alors que les cDC du sang n'expriment que faiblement CCR7 à l'état immature, une forte expression de ce récepteur a été observée sur les PDC humaines immatures (295). Cette observation est en accord avec une étude préalable montrant que les PDC à l'état basal migrent vers la zone T des nœuds lymphatiques et la pulpe blanche de la rate de manière dépendante de ce récepteur (en réponse à CCL19/CCL21 sécrétés par les cellules fibroblastiques réticulaires de la zone marginale) et de CXCR4 (286). L'invalidation de CCR7 dans les PDC murines en condition basale ou inflammatoire, a confirmé un défaut de migration des PDC vers les nœuds lymphatiques (296). Après maturation en présence de CD40L et IL-3, l'expression de CCR7 par les PDC humaines est augmentée alors que les récepteurs CCR5, CXCR4 et CXCR3 ne sont plus détectables à leur surface (295). Ces données suggèrent donc une régulation de la migration des PDC au cours de leur maturation faisant intervenir différentes combinaisons de chimiokines.

Il a également été observé que les PDC immatures exprimaient le récepteur à la chémérine : ChemR23 (297,298). Cette chimiokine est exprimée par les cellules endothéliales des HEV dans les organes lymphoïdes secondaires, permettant la transmigration des PDC vers ces organes (298). L'expression de la chémérine est également décrite pour des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins du derme de patients atteints de lupus érythémateux systémique et de psoriasis, où elle est associée avec l'accumulation de PDC dans le derme (298,299). Ceci suggère l'implication du couple ChemR23/chémérine dans le recrutement des PDC lors de ces pathologies.

Les PDC possèdent une localisation particulière et leur migration (vers les organes lymphoïdes secondaires) dans les conditions physiologiques et inflammatoires implique les récepteurs CXCR4, CCR7, possiblement CXCR3 et CCR5, ainsi que chemR23.

2. Capture de l'antigène et activation

Les PDC se distinguent également des cDC par leur panel de PRR (*pathogen recognition recepteur*) capables de percevoir les signaux de danger. Parmi ces derniers, les TLR (*toll like réceptors*) sont connus pour être fortement impliqués dans cette perception, entrainant l'activation des DC. Nous nous limiteront ici au développement de cette famille.

i. Les Toll Like Receptors

Les cDC humaines expriment les TLR1/2/3/4/5/6/8 et 10 leur permettant de reconnaitre toute une palette de signaux de danger issus de différents agents pathogènes (ex : le LPS par TLR4, la flagelline par TLR5). Les PDC humaines expriment principalement les TLR7 et TLR9 (300). Ces derniers sont exprimés dans les endosomes, permettant la reconnaissance respectivement des ARN simple brin et des motifs CpG déméthylés de l'ADN (motifs dinucléotidiques CG de l'ADN issu de procaryotes). La stimulation de ces TLR7/9 entraine une forte sécrétion d'IFN de type I (chez l'homme : IFNα, IFNβ, IFNω et IFNτ (301)), caractéristique des PDC (302). Cette stimulation provoque aussi l'augmentation des molécules de costimulation, comme CD80/CD86, de présentation de l'Ag CMH de classe II, et la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNFα, IL-6, IL-8) leur permettant de recruter et d'activer d'autres partenaires de l'immunité (303). Par exemple, la chimiokine CXCL8, aussi appelée IL-8, recrute les polynucléaires neutrophiles. L'engagement des TLR par leurs ligands active les fonctions innées (sécrétion d'IFN de type I, cytokines inflammatoires) et adaptatives (présentation de l'antigène) des PDC.

Le récepteur TLR9 peut reconnaitre 3 principales classes de motifs CpG. La localisation endosomale du complexe TLR9/CpG a été montrée comme déterminante pour la réponse IFN de type I ou la maturation des PDC. Les CpG de type A possèdent une queue 3' poly-G leur permettant de s'agréger et de s'accumuler dans les endosomes précoces. Ils entrainent une forte production d'IFN de type I, mais possèdent une faible capacité d'induire la maturation des PDC. La rétention des CpG-A dans l'endosome précoce permet une signalisation dépendante de la voie TLR9-MyD88-IRF7 (304). La capacité des PDC à induire une sécrétion rapide et soutenue d'IFN-α implique le facteur de transcription IRF7, fortement exprimé dans le cytosol des PDC, ainsi qu'une boucle de régulation positive *via* le récepteur à l'IFN de type I, IFNAR (305). Il a été démontré que la monomérisation des CpG-A induisait leur localisation dans l'endosome tardif (LAMP-1+), conduisant à la maturation des PDC (306). Les CpG de type B quant à eux, restent sous forme monomérique et se localisent principalement dans les endosomes tardifs, induisant la maturation des PDC. Ils sont de faibles inducteurs de la sécrétion d'IFN de type I. Contrairement à l'effet de la monomérisation des CpG-A,

la formation de complexes de CpG-B entraine leur rétention dans l'endosome précoce et une production plus soutenue d'IFN de type I (306). La maturation des PDC par stimulation CpG-B implique l'activation des voies de signalisation passant par NF-κB, ainsi que celle des MAPK et IRF5 (303). Une troisième classe de CpG, les CpG-C, pouvent se localiser dans les deux endosomes (en fonction de leur conformation en « épingle à cheveux » ou dimérique) et possèdent la double activité d'induire une forte sécrétion d'IFN de type I et la maturation des PDC (306,307). Ainsi, selon la classe de CpG stimulant TLR9, différentes voies de signalisation seront engagées.

Le récepteur TLR7 reconnait des ARN viraux simples brins, alors que les ARN viraux doubles brins sont reconnus par le TLR3 (308). La stimulation TLR7 induit une forte activation de la voie NF-κB et de la voie MAPK responsable de la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-8), de l'augmentation des molécules de costimulation (comme CD80/CD86), mais aussi de la sécrétion d'IFN de type I. Il a également été observé que la stimulation TLR7 entrainait l'expression de TRAIL par les PDC leur permettant d'acquérir une fonction cytotoxique directe contre les cellules infectées. L'induction du gène codant pour TRAIL (induit par les IFN de type I), a été démontrée comme indépendante de l'activation de NF-κB, mais implique directement STAT1 en réponse à TLR7 (309). Les imidazoquinolines (composés aux propriétés antivirales), comme le R848 sont également des ligands de TLR7 (310), (Figure 13).

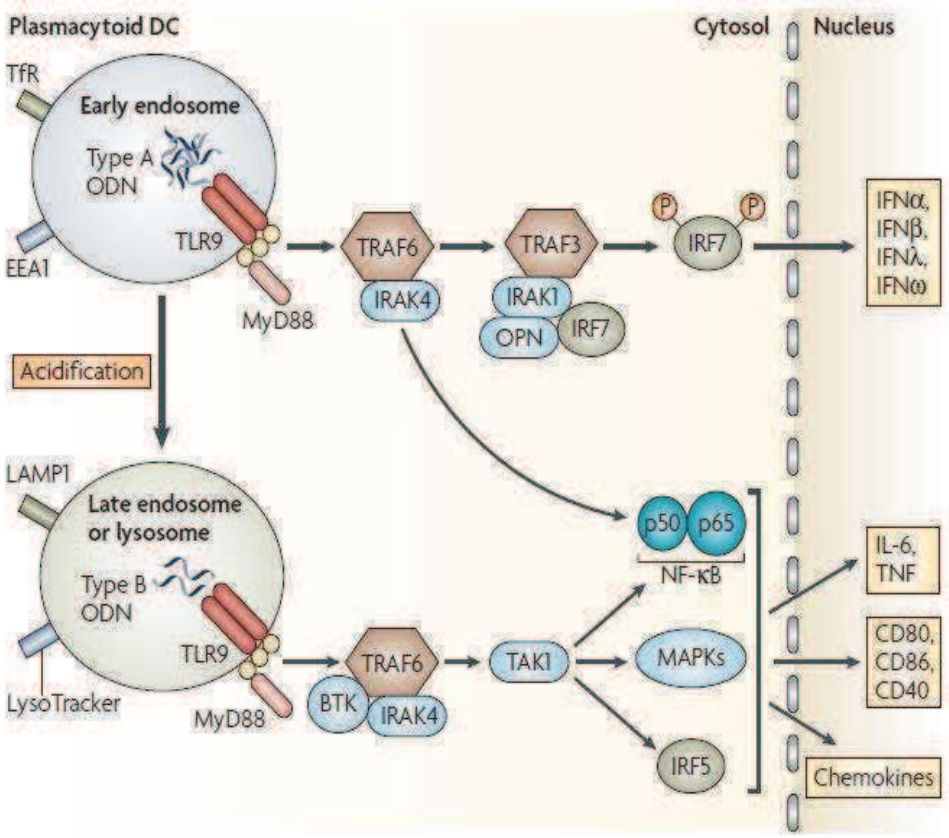


Figure 13 - Signalisation des voies TLR7/9 dans les PDC.
Dans les PDC, la liaison de CpG-A multimériques dans l'endosome précoce (caractérisé par l'expression du récepteur à la transferrine (TfR) et l'antigène 1 des endosomes précoces (EEA1)) induit l'activation du TLR9. La stimulation du TLR9 entraine l'activation de MyD88, initiant la cascade de signalisation impliquant IRF7 (*interferon-regulatory factor 7*), qui est à l'origine de la forte production d'IFN de type I. Au contraire, les CpG-B sont monomériques et lient TLR9 dans les endosomes tardifs (caractérisés par l'expression de LAMP-1 et de la molécule LysoTracker). Cette liaison induit l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant NF-κB, MAPK et IRF5, ce qui conduit à une réponse différente des PDC excluant la forte production d'IFN-type I. Abréviations : BTK, *Bruton's tyrosine kinase*; IRAK, *interleukin-1-receptor-associated kinase*; OPN, ostéopontine; TAK1, *transforming-growth-factor-β-activated kinase 1* ; TRAF, *tumor-necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor*. Issu de la référence (303).

ii. Récepteurs membranaires régulateurs des PDC

La régulation de la réponse des PDC aux signaux de danger peut se faire par une série de récepteurs permettant une reconnaissance directe (ex : récepteurs de type lectine C) ou indirecte (ex : récepteurs Fc). Le marqueur BDCA2 (*blood DC antigen 2*) est une protéine de type lectine C, spécifiquement exprimée sur les PDC. Elle présente la capacité d'inhiber la sécrétion d'IFN de type I induite par la stimulation TLR. De manière intéressante, la liaison d'un anticorps à BDCA2 entraine son internalisation et la présentation de dérivés peptidiques de l'anticorps sur les molécules de CMH de classe II, permettant l'induction d'une prolifération lymphocytaire T (311). BDCA2 régule donc à la fois la production d'IFN de type I et la présentation d'antigènes. L'internalisation d'un antigène par liaison au BDCA2 n'augmente pas l'expression des molécules de costimulation et induit une réponse tolérogène impliquant des Treg spécifiques de l'antigène internalisé. Au contraire, la présence d'un agoniste TLR7 durant la prise en charge de l'Ag permet une augmentation des molécules de costimulation et induit une réponse T CD4 effectrice (312). Le récepteur membranaire ILT7 (*Immunoglobulin-like transcript 7*) a également été démontré comme inhibant la production d'IFN de type I induite par les ligands de TLR7/9 (313). Il a été observé que BDCA2 et ILT7 s'associent au récepteur FcεRIγ présent à la surface des PDC (313,314). L'activation de ce dernier montre également une inhibition de la production d'IFN type I induite par TLR9, ainsi que le détournement de la polarisation T CD4 de la voie Th1 à Th2 (315). Le FcεRIγ possède des motifs intracellulaires ITAM *(Immunoreceptor-based tyrosine activation motif)* qui communément à d'autres récepteurs des PDC (FcγRIIA (316) et NKp44 (317), Siglec‑H chez la souris (318) associé à DAP12 porteur de ITAM) semblent à l'origine de la diminution de la sécrétion d'IFN de type I, induite par les ligands TLR.

Le récepteur ILT3 (également présent sur les DC différenciées à partir des progéniteurs CD34+ ou des monocytes, à un niveau plus faible) est également fortement exprimé par les PDC (319). Ce dernier a été identifié comme permettant d'internaliser l'antigène et d'induire une prolifération lymphocytaire T spécifique de cet antigène par les monocytes (320). Il a étgalement été identifié comme régulant la réponse inflammatoire des DC, par inhibition de NF-κB, après stimulation par les TLR (321). Cependant peu de données sont disponibles quant à son action dans les PDC.

Il a également été décrit qu'un autre marqueur des PDC, le BDCA4 (aussi appelé neuropilin-1) pouvait prévenir la production d'IFN de type I par le TLR9 (322).

Le récepteur type lectine C, DCIR, a également été identifié comme exprimé sur les PDC. Ce récepteur peut réprimer l'induction d'IFN de type I induite par TLR9 et possède la capacité d'internaliser l'antigène et d'induire une prolifération lymphocytaire T spécifique de cet antigène (323).

Ainsi, en complément des récepteurs TLR7 et 9 activateurs des PDC, différents récepteurs appartenant à la famille de type Lectine C (BDCA2, DCIR) ou ILT (ILT7/3) peuvent réguler les fonctions des PDC impliquant l'internalisation d'antigène et la réponse inflammatoire.

La plupart des ligands naturels des récepteurs de types lectine C restent cependant méconnus.

iii. Récepteurs aux phosphatidylsérines (PS)

Les récepteurs permettant l'internalisation de l'antigène et la modulation de la réponse immunitaire associée sont très impliqués dans la prise en charge des corps apoptotiques par les macrophages. Bien que les PDC aient été décrites comme ayant une faible capacité de prise en charge des cellules apoptotiques et nécrotiques (324,325), il a été démontré qu'elles intervenaient de manière indirecte dans la tolérance induite par les cellules apoptotiques (326). Cette implication peut être due à des facteurs solubles sécrétés par les cellules phagocytaires ainsi que la capture d'autres dérivés cellulaires générés durant le processus d'apoptose, comme les exosomes, les corps apoptotiques ou encore les microparticules (325,327). La capture de ces dérivés cellulaires exprimant les PS a été décrite dans les macrophages comme impliquant les récepteurs aux PS. Parmi ces derniers, les membres de la famille des récepteurs TAM (*TYRO3, AXL, MERtk familly*) (328), et les TIM-1/3/4 (*T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin*) (329). La caractérisation de ces récepteurs à la surface des PDC reste à ce jour incomplète. Nous nous baserons donc sur les données disponibles pour les cDC et les macrophages afin d'introduire ce travail de thèse.

Les TAM sont des récepteurs à activité tyrosine kinase pouvant s'activer par regroupement lors de la reconnaissance de leur ligand. Ils peuvent lier les PS à la surface des corps apoptotiques par l'intermédiaire d'une molécule de pontage (GAS6 ou Protéine S), entrainant une signalisation conduisant à l'endocytose et à l'inhibition de la réponse inflammatoire (152). Cette inhibition a été démontrée pour les DC (CD11c+) de souris comme inhibant la production d'IFN de type I, IL-6 et TNFα en réponse à une stimulation TLR (TLR3, 4 ou 9). Il a été observé un mécanisme impliquant l'induction des protéines de régulation SOCS1/3 (*Suppressor cytokine signaling 1/3*) pouvant inhiber la signalisation des récepteurs TLR (interactions avec MyD88 et TRIF). De manière intéressante, il a été observé que l'expression des TAM pouvait résulter de la signalisation au récepteur à l'IFN de

type I (IFNAR) (330,331). Ceci constitue une boucle d'autorégulation de l'inflammation (Figure 14) (332). Elle n'est cependant pas décrite dans les PDC.

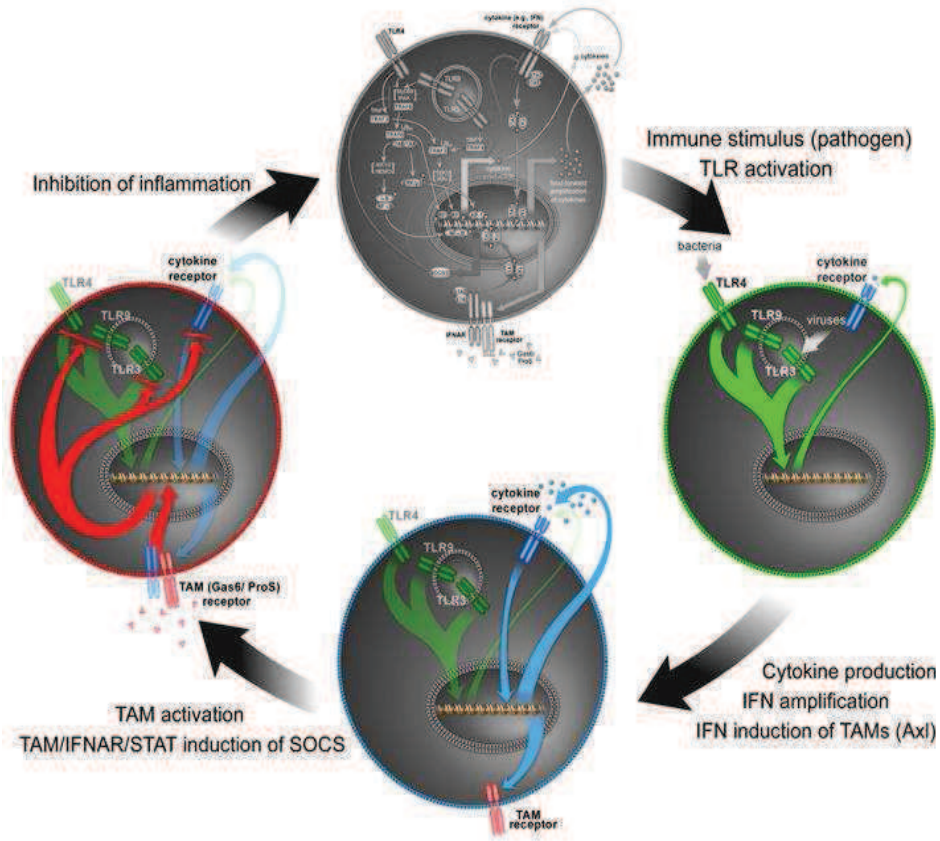


Figure 14 - Régulation de la réponse inflammatoire par les récepteurs de la famille TAM dans les DC myéloïdes.
Représentation schématique du cycle de l'inflammation initié par les ligands TLR (vert) dans des DC myéloïdes. L'activation des TLR induit la sécrétion initiale de cytokines (dont l'IFN de type I pour les TLR7/3/9). Cette amplification se fait de manière autocrine (mais peut également avoir lieu de manière paracrine). La stimulation du récepteur IFNAR conduit à l'induction du récepteur TAM Axl, via la voie STAT1 (bleu). L'activation des TAM conduit à l'induction du facteur SOCS, inhibant la réponse TLR. Adapté de la référence (332).

La régulation de l'inflammation par les récepteurs TAM a aussi été décrite comme impliquant l'activation du récepteur nucléaire LXR, qui à son tour pourra inhiber le facteur de transcription NF-κB (152). Dans des DC murines, l'internalisation de cellules apoptotiques a démontré une prévention de l'activation de la voie NF-κB (induite par TLR4) par l'engagement de Mertk. Cet effet était dépendant de l'activation d'Akt, montrant une voie de régulation de l'inflammation alternative (333). Mertk et Axl ont été observés à la surface des PDC (331,334). Cependant, à l'heure actuelle, aucun mécanisme de régulation impliquant ces récepteurs n'a été rapporté.

Les récepteurs TIM-1/3/4 possèdent un domaine de liaison aux PS. Cependant, leur expression cellulaire diffère. TIM-1 est préférentiellement exprimé sur les lymphocytes T Th2, et joue un rôle important dans les réactions inflammatoires pulmonaires (335). TIM-1 a également été observé à la surface des cellules rénales humaines, leur permettant de phagocyter des cellules apoptotiques et de

maintenir l'homéostasie tissulaire (336,337). TIM-3 est préférentiellement exprimé sur les lymphocytes T Th1 et CD8 Tc1 pouvant réguler l'apoptose de ces cellules (338), mais également sur des cellules rénales (humaines et murines), des DC (CD8+) et des Mρ murins contribuant à la phagocytose et la présentation d'antigènes provenant de cellules apoptotiques (339). Enfin, TIM-4 est exclusivement exprimé par des cellules présentatrices de l'antigène (APC), où il est impliqué dans la phagocytose des cellules apoptotiques et le maintien de la tolérance (336,340). Il a été observé comme pouvant interagir avec TIM-1 à la surface des lymphocytes T, augmentant leur prolifération et la différenciation vers un profil Th1 (341). De plus, il a été observé que TIM-4 et TIM-1 pouvaient lier des exosomes *via* les PS à leur surface (342). Le récepteur TIM-4, contrairement aux autres récepteurs aux PS, est un récepteur d'attache (*tethering receptor*) sans domaine de signalisation (343). Aucune donnée n'est disponible à notre connaissance, concernant l'expression des récepteurs TIM par les PDC.

Le récepteur BAI1 (*Brain specific Angiogenesis Inhibitor 1*) a été décrit comme permettant la reconnaissance (par liaison aux PS) et la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages (344). BAI1 est une protéine transmembranaire de type G. La liaison aux PS de BAI1 permet une signalisation par son association avec les protéines ELMO1/DOCK, et l'activation de Rac ce qui entrainera le réarrangement du cytosquelette d'actine permettant la phagocytose des corps apoptotiques (344). Récemment, il a été démontré que l'activation de BAI1 induisait l'expression du transporteur de cholestérol ABCA1 (345). Ce dernier, initialement décrit comme induit par les récepteurs LXR, exerce un effet anti-inflammatoire par déprivation de la cellule en cholestérol (169). L'expression de BAI1 et son effet sur la réponse inflammatoire des PDC reste cependant à démontrer.

La stabiline-2 (également appelée HARE et FEEL-2) est un autre récepteur aux PS, décrit comme impliqué dans la prise en charge des érythrocytes apoptotiques par les macrophages, et induisant la sécrétion de TGF-β (346). La stabiline-2 a également été observée sur des cellules endothéliales murines (347), et a montré une implication dans la prise en charge de corps apoptotiques et nécrotiques par les fibroblastes (348).

Du fait de leur capacité à lier les PS, ces récepteurs ont principalement été étudiés dans la prise en charge des corps apoptotiques. Cependant, il n'y a pour l'heure pas de données sur l'expression de ces récepteurs par les PDC.

3. Profil de maturation des cellules dendritiques plasmocytoïdes

Les PDC sont impliquées dans plusieurs mécanismes de l'immunité innée, mais également dans le passage de relais à l'immunité adaptative. Parmi les principales fonctions des PDC dans l'immunité innée, la sécrétion de cytokines, dont les IFN de type I, en réponse aux dérivés viraux, est la plus caractéristique.

i. Les IFN de type I et autres cytokines

La famille des IFN est composée de 2 principaux types que sont les IFN de type I (-α, -β, -ε, -κ, -ω) et IFN de type II (IFN-γ). Plus récemment, un troisième type d'IFN a été identifié, possédant des activités antivirales communes aux IFN de type I : IFN-λ (349).

Les IFN de type I forment chez l'homme une famille de protéines codées par 13 gènes pour l'IFN-α (-α1, -α2, -α4, -α5, -α6, -α7,-α8, -α10, -α13, -α14, -α16, -α17 et -α21), 1 gène codant pour l'IFN-β, 1 gène pour l'IFN-ε, 1 gène pour l'IFN-κ et 1 gène pour l'IFN-ω. Ces cytokines se lient avec le récepteur à l'IFN de type 1 composé des deux chaines IFNAR1 et IFNAR2, induisant une réponse antivirale, antiprolifération, antitumorale et immunomodulatrice. La chaine IFNAR2 possède une forte affinité pour l'IFN-α. Cependant, les deux chaines sont nécessaires à l'induction d'une signalisation. Cette dernière passe par l'association aux protéines JAK1 (Janus Kinase I) et TYK2 (Tyrosine Kinase 2), entrainant l'activation des intermédiaires STAT1 et STAT2, formant avec l'IRF-9 le facteur de transcription ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). Ce dernier pourra alors se fixer sur les éléments de réponse à l'IFN (ISRE pour *IFN-stimulated response element*) présents dans les promoteurs de gènes codants pour des protéines antivirales (350). D'autres voies de signalisation induites par les IFN de type I ont été observées telles que la formation d'homodimères de STAT1; l'activation de STAT3 inhibant STAT1 et permettant donc de réguler la réponse inflammatoire (351); mais aussi la production des SOCS1/3 permettant d'inhiber la stimulation des TLR et la réponse inflammatoire induite (Figure 14) (332). La signalisation à l'IFN de type I peut être modulée par différentes voies telles que celles induites par les TLR endosomaux (TLR7 et 9 principalement dans les PDC humaines, ainsi que les TLR8 et TLR3), les récepteurs de type lectines C (CLR) membranaires, les récepteurs de type RIG-I ou RLR (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*) et de type NOD ou NLR qui ont une expression cytoplasmique (352).

Dans les PDC, les IRF5 et 7 (activés par les TLR7 et 9) sont responsables de l'induction d'IFN de type I. Il a été démontré que la présence d'IRF7 était nécessaire dans les PDC murines à la production des IFN de type I par stimulation virale ou *via* les CpG-A (353). L'étude de PDC murines

invalidées pour IRF5 montre une diminution de la production d'IFN-α et β ainsi que de la cytokine inflammatoire IL-6, après la stimulation des voies TLR7 et TLR9 (354). La production d'IFN-β et d'IL-6 en réponse à une stimulation de la voie TLR9 fait intervenir une interaction entre IRF5 et p50 (sous-unité active de NF-κB) (355). Ces données ont été démontrées à l'aide de la lignée PDC humaine, CAL-1. Lors de cette même étude, il a été observé que l'invalidation de p50 diminuait la production d'IFN-β alors qu'au contraire, l'invalidation d'IRF8 l'augmentait. Des résultats similaires sont obtenus pour la régulation de l'IL-6 (355). Ces données suggèrent un mécanisme de corégulation de la production d'IFN-β et de l'IL-6 par la voie NF-κB/IRF5 (inducteur), et un effet inhibiteur d'IRF8. Les voies NF-κB (p50/p65) et p38MAPK ont également été observées comme collaborant pour l'activation d'IRF7, contribuant ainsi à la production d'IFN de type I par les PDC humaines stimulées par CpG-A (356), (Figure 15). L'importance de la voie NF-κB dans la maturation des PDC est bien illustrée avec des PDC murines invalidées pour NF-κB (*nfkb1*/*c-rel*). Ces PDC conservaient leur capacité à sécréter de l'IFN-α, mais montraient un défaut de production d'IL-6, IL-12 et d'expression de molécule de CMH de classe II, ainsi qu'une capacité réduite d'induction de la prolifération lymphocytaire T (357). Il est à noter que la production d'IL-12 par les PDC humaines a longtemps été sujette à controverse. Cependant une étude de 2001 semble indiquer qu'une stimulation par CpG-B et CD40L permet une forte production d'IL-12 qui serait augmentée par une pré-incubation avec de l'IL-3. La sécrétion d'IL-12 par les PDC semblait indispensable à la différenciation lymphocytaire T vers le profil Th1 (358). Cette sécrétion a par la suite été confirmée (359). Dans les PDC humaines, la stimulation TLR7 induit la sécrétion de TNFα et d'IL-6, impliquant les intermédiaires de signalisation des voies NF-κB (p65, c-Rel, p50), ainsi que IRF5, c-Jun (MAPK) et IRF8 (360).

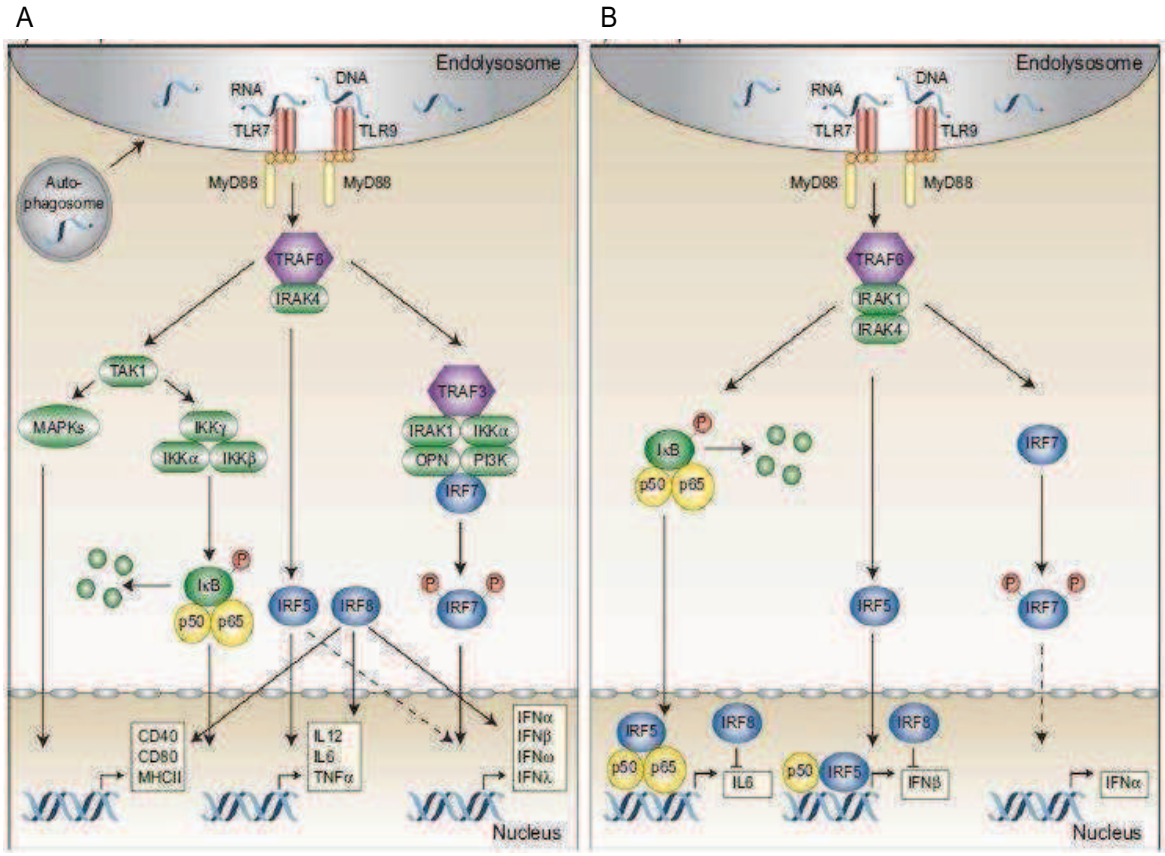


Figure 15 - Signalisation TLR7/9 dans les PDC murines et humaines.
(A) Dans les PDC murines. L'activation des TLR va induire *via* MyD88 et IRAK4, l'activation de l'ubiquitine ligase TRAF6. TRAF6 va ubiquitiner TAK1, conduisant à l'activation de la voie MAPK et du complexe IKK constitué de IKK-α, IKK-β, et IKK-γ. IKK-β activé va phosphoryler IκB entrainant sa dégradation par le protéasome et la translocation nucléaire des sous-unités de NF-κB p50/p65. Le complexe MyD88/TRAF6/IRAK4 active IRF7 *via* le complexe TRAF3/IRAK1/IKK-α/ostéopontine (OPN)/PI3K, conduisant à la phosphorylation d'IRF7 et sa translocation nucléaire. IRF5 régule positivement l'induction des cytokines pro-inflammatoires et les IFN de type I (principalement IFN-β). IRF8 régule positivement l'induction des cytokines pro-inflammatoires et les IFN de type I. Il est aussi impliqué dans l'expression des molécules de costimulation telles que CD40, CD80, et CMH II. (B) Dans les PDC humaines. L'activation des TLR conduit à la formation d'un complexe contenant MyD88/IRAK4/IRAK1/TRAF6. Celui-ci permet la translocation nucléaire des sous unités de NF-kB p50 et p65 et d'IRF5. IRF5 coopère avec NF-κB p50 et p65 pour induire la transcription de l'IL-6. Le complexe NF-κB p50/IRF5 est crucial à l'induction de l'IFN-β. IRF-8 fonctionne comme un répresseur de la production d'IL-6 et IFN-β. L'IRF-7 ne joue pas un rôle significatif dans la production d'IFN-β et son implication dans l'induction d'IFN-α n'est que partiellement révélée. Adapté de la référence (361)

ii. Les Chimiokines

En complément des cytokines inflammatoires et des IFN décrits ci-dessus, les PDC participent à la sécrétion d'un panel de molécules impliquées dans la domiciliation cellulaire et l'attraction des cellules immunitaires.

La stimulation des PDC par la voie TLR7 induit la production des ligands de CXCR3 tel que : CCL5 (RANTES), agissant sur les LT mémoires et les monocytes ; CXCL11 (ITAC) et CXCL9 (MIG), agissant sur les LT activés. La chémokine CXCL10 (IP10) qui stimule la migration des monocytes, lymphocytes NK et T, a également été détectée, de même que l'IL-8, CXCL1, CXCL2 et CXCL3 qui stimulent la migration des lymphocytes T et B, des monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles et mastocytes. Seuls deux récepteurs aux chimiokines ont été retrouvés comme surexprimés après stimulation de la voie TLR7 dans les PDC : CXCR4 et CCR7 (360,362). CCR7 est impliqué dans la migration des PDC vers les organes lymphoïdes secondaires (voir Ch.II.II.1).

iii. Apprêtement et présentation de l'antigène (Ag)

Cet aspect n'a pas été étudié de manière étendue dans ce travail de thèse, et donc, nous n'évoquerons que succinctement la présentation d'antigènes et la polarisation lymphocytaire. Il ne faut cependant pas négliger ce rôle des PDC.

Une étude transcriptomique a révélé l'induction de gènes codants pour des protéines impliquées dans l'apprêtement et la présentation de l'Ag (360). Les transporteurs de peptides antigéniques TAP1 et TAP2 (permettant le transport des peptides issus du cytosol vers le réticulum endoplasmique pour son chargement sur les molécules du CMH) ainsi que les molécules de CMH de classe II ont été observés comme modérément augmentés lors de la maturation induite par stimulation de la voie TLR7. L'induction des molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40 a également été observée, ainsi que TNFSF9 (4-1BBL) qui est impliqué dans la polarisation Th1 après liaison a son récepteur 4-1BB exprimé par les lymphocytes T CD4, et dans l'expansion des lymphocytes T CD8 (363,364).

L'expression des molécules de présentation de l'Ag (CMH II), de costimulation (CD80/CD86) ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNFα et IL-8) par les PDC humaines, ont également été observées après stimulation de la voie TLR9 par les CpG-B, et dans une moindre mesure par les CpG-A (305). Ces données montrent donc que la stimulation des voies TLR7 ou TLR9 dans les PDC confère à ces cellules une capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires (*via* l'expression de CCR7), d'apprêtement et de présentation de l'Ag, ainsi que de costimulation, permettant l'activation des lymphocytes T (360).

4. Induction d'une réponse spécifique

L'activation de lymphocytes T naïfs par les cellules présentatrices d'antigènes (APC pour *antigen presenting cells*) nécessite 3 signaux que sont : 1) la reconnaissance du peptide antigénique (interaction [CMH+peptide] avec le complexe TCR/CD3) ; 2) l'engagement de molécules de costimulation (principalement CD80/CD86 sur les DC avec CD28 des lymphocytes T naïfs) ; 3) un signal de prolifération et de différenciation induit par les cytokines de l'environnement (cytokines des DC comme l'IL-12 et de lymphocytes T activés comme IL-2). Les DC ont initialement été caractérisées comme pouvant induire une réponse lymphocytaire T à travers ces 3 signaux (voir ChII.I). Cette fonction a également été rapportée pour les PDC.

Une première étape à l'apprêtement d'Ag exogènes est leur capture. Contrairement aux cDC, les PDC sont présentées comme des cellules à faible capacité de capture de l'Ag. Il est démontré d'une part que les PDC sont incapables de prendre en charge des corps apoptotiques, du zymosan ou des particules artificielles (281,324,365,366), alors que d'autres études semblent indiquer le contraire (367,368). Les raisons de ces disparités ne sont pas encore clairement définies, mais pourraient inclure des différences de stimulation ou de mode de purification. Au contraire, la prise en charge de protéines solubles par les PDC semble mieux caractérisée montrant entre autres une prise en charge efficace d'ovalbumine ou de lysozyme issu d'œufs de poule *in vitro* et *in vivo* (287,369). Ces protéines peuvent être internalisées par macropinocytose, micropinocytose ou endocytose médiée par les récepteurs. Les principaux récepteurs participant à cette internalisation sont cités ci-dessus, incluant les récepteurs de type lectine C (dont BDCA2 (311), Siglec-H (318) et DCIR (323)), aux fragments Fc (dont FcγRIIA (316), FcεRIγ) et des récepteurs aux PS (voir ChII.II.2). Ces récepteurs ont également été impliqués dans d'autres cellules comme pouvant participer à la prise en charge de dérivés cellulaires tels que les exosomes et microparticules (325,327).

Une autre étape déterminante de l'initiation d'une réponse T CD4 est la présentation des peptides antigéniques dépendante de l'expression membranaire des molécules du CMH de classe II.

Les cDC immatures présentent un *turnover* important des molécules du CMH de classe II leur permettant de maintenir un niveau constant d'expression membranaire. L'activation de ces cellules induit une augmentation de la prise en charge des antigènes et de l'expression des molécules du CMH de classe II. Ces molécules néosynthétisées sont initialement exprimées au niveau endosomal où elles pourront être chargées avec le peptide antigénique avant leur expression membranaire. Le *turnover* est alors régulé négativement permettant une expression prolongée des complexes

CMH/peptide à la membrane cellulaire (370). Cette régulation de l'expression des molécules de CMH de classe II au cours de la maturation n'est pas retrouvée dans les PDC. Le *turnover* est maintenu, ce qui empêche une expression prolongée et stable des complexes CMH/peptide permettant une présentation efficace aux lymphocytes T CD4 (369). La présence d'Ag en grande concentration peut permettre cependant l'activation d'une réponse lymphocytaire T CD4 comme observée *in vitro* (358). Une source importante d'Ag est fournie par les protéines endogènes à la cellule. Les peptides antigéniques sont générés au sein du cytosol par les protéases. Ils sont alors chargés sur les molécules du CMH de classe I (au sein du réticulum endoplasmique), formant un complexe qui sera exprimé à la membrane cellulaire pour être reconnu par les lymphocytes T CD8. Une partie des peptides endogènes (principalement issus des protéines membranaires recyclées par la voie endosomale, issus des protéines de l'endosome lui-même, ou rejoignant les endosomes *via* l'autophagie) pourront également être présentés par les molécules du CMH de classe II. Ces peptides sont issus de protéines exprimées constitutivement ou dérivées de virus infectant les PDC (369,371–373). Un dernier mode d'apprêtement permet la présentation par les APC de peptides issus d'Ag exogènes par le CMH de classe I. On parle de présentation croisée (*cross-presentation*). Ce mécanisme principalement décrit pour les cDC2 BDCA3+ humaines (DC CD8α+ murines), a aussi été observé pour des PDC humaines, permettant l'initiation d'une réponse lymphocytaire T CD8 après endocytose d'Ag (368,374,375).

Ainsi, les PDC peuvent initier une réponse T CD4 *in vivo* (376), entrainant principalement une polarisation Th1 (377), ainsi qu'une réponse T CD8 (368,372,374,375).

La reconnaissance d'un Ag par un lymphocyte T ne conduit pas nécessairement à une réponse effectrice. En fonction des signaux engagés, elle peut conduire à une réponse tolérogène, une anergie, ou l'avortement de la réponse engagée.

Il a été observé *in vitro,* que les PDC humaines présentaient la capacité d'induire la différenciation *in vitro* de lymphocytes T CD4 en T régulateurs (Treg) producteurs d'IL-10 (378,379). Cet effet a également été observé *in vivo* dans le thymus humain (380), dans un modèle murin de tumeur pour lequel la contribution d'IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*) dans les PDC a été démontrée (381), ainsi que dans un modèle d'allogreffe cardiaque (367), de sclérose en plaque (382) et de maladie du greffon contre l'hôte (383). L'implication de l'enzyme IDO a également été démontrée dans l'induction de Treg par des PDC humaines *in vitro* (384).

Ces différentes données semblent suggérer que l'initiation d'une réponse inflammatoire ou tolérogène par les PDC dépend du contexte et de l'organe dans lequel s'effectue l'interaction PDC/Lymphocyte T. Ce sujet est présenté ici pour information, mais ne fera pas l'objet de ce travail de thèse.

5. Cellules dendritiques plasmocytoïdes et pathologies inflammatoires chroniques

Les PDC possèdent la capacité de produire de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux acides nucléiques exogènes (porteurs de motifs CpG déméthylés), mais également aux acides nucléiques du soi, complexés avec des protéines (auto-anticorps formant des complexes immuns) ou avec des peptides (antimicrobiens comme LL37, la cathélicidine des NET [*neutrophil extracellular traps*] ou la calprotectine) (385). La production d'IFN-α par les PDC peut aussi résulter de l'interaction avec l'ADN mitochondrial (possédant des îlots CpG déméthylés du fait qu'il dérive d'une endosymbiose entre des bactéries aérobies et les cellules eucaryotes (386)). L'implication de cette signature IFN est retrouvée dans plusieurs pathologies auto-immunes, dont le lupus érythémateux systémique (LES) (387), le syndrome de Sjögren (388), ou encore le psoriasis (389). A noter que la signature IFN retrouvée dans les conditions pathologiques n'est pas seulement liée aux PDC. Deux articles récents suggèrent qu'un blocage des caspases lors de la mort cellulaire d'une cellule pourrait être responsable de la production d'IFN de type I par l'absence de désactivation de l'ADN mitochondrial (dégradation par les caspases-3/7) et l'implication de cGAS (390,391).

Le dérèglement de la mort cellulaire et du processus physiologique d'élimination des cellules apoptotiques joue un rôle majeur dans les maladies auto-immunes systémiques, notamment le LES. Les cellules nécrotiques libèrent des signaux de « danger » endogènes (les DAMP), responsables de l'activation des PDC. Ces signaux de danger peuvent également être fournis par les polynucléaires neutrophiles *via* la libération de NET dans le milieu extracellulaire (lors du phénomène de NETose) (392), pouvant participer à la physiopathologie des maladies auto-immunes impliquant les PDC (393).

i. Reconnaissance des acides nucléiques du soi

Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'induction d'une réponse inflammatoire déclenchée par les acides nucléiques du soi, dont l'acide nucléique mitochondrial riche en motifs CpG déméthylés (394), mais aussi les acides nucléiques complexés à des auto-anticorps, ainsi qu'à d'autres protéines comme LL37 (aussi appelé CRAMP) ou HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*). LL37 correspond à un peptide antimicrobien produit par les kératinocytes et les polynucléaires neutrophiles. Il est

surexprimé dans les lésions cutanées de patients psoriasiques. Ce peptide, comme d'autres peptides antimicrobiens, forme un complexe avec l'ADN (provenant des cellules mortes ou des NET). Ce complexe permet la translocation et la rétention de l'ADN dans l'endosome précoce des PDC, induisant la sécrétion d'IFN-α par stimulation de la voie TLR9 (395). Des complexes auto-immuns (acides nucléiques/IgG) circulants sont caractéristiques des patients lupiques. Ces complexes peuvent induire la sécrétion d'IFN-α par des PDC, *via* l'endocytose impliquant la liaison aux récepteurs FcR membranaires (396). Un autre partenaire potentiel a été observé comme surexprimé dans des lésions cutanées de patients lupiques, ainsi que dans les glandes salivaires de patients souffrant du syndrome de Sjögren. Il s'agit de la protéine nucléaire HMGB1 (397,398). Cette protéine, abondante dans les noyaux cellulaires où elle lie l'ADN et la chromatine, est libérée lors de la nécrose cellulaire, mais aussi lors de l'activation des macrophages, cDC ou PDC. Elle peut agir de manière autocrine et paracrine (sur les lymphocytes T) par liaison à son récepteur RAGE, pour promouvoir l'activation des cellules cibles (399–401). La liaison de HMGB1 sur son récepteur RAGE exprimé par les PDC, ainsi que sa capacité à lier l'ADN, ont amené à la démonstration que HMGB1 était un constituant des complexes immuns. Bien qu'il ne contribue pas directement à l'endocytose de ces complexes, il augmente l'induction d'IFN-α par les PDC de manière dépendante de la voie TLR9 dans les endosomes précoces (HMGB1 liant préférentiellement des complexes d'ADN multimériques), (Figure 16). Ce complexe multimériques active aussi les LB autoréactifs (402). Les ARN contenus dans les complexes auto-immuns peuvent aussi contribuer à l'activation des PDC et des LB par l'engagement de la voie TLR7 (403). La modulation de l'expression de ce récepteur a été montrée comme cruciale pour le contrôle de l'activation des PDC et des LB dans les pathologies auto-immunes impliquant ces complexes (404). Une étude récente dans le diabète de type I rapporte que la mort des cellules β du pancréas recrute et active de manière séquentielle les lymphocytes B1a, les neutrophiles puis les PDC. En effet, les PDC sont activées par les acides nucléiques du soi libérés par les cellules mortes, complexés avec les auto-anticorps anti-ADN produits par les lymphocytes B1a ou avec la cathélicidine des NET libérée par les neutrophiles. Ces différents sigaux pourront entrainer la production de grandes quantités d'IFN de type I par les PDC (393).

En résumé, les PDC et les voies TLR7 et 9 sont impliquées dans différentes pathologies auto-immunes notamment après reconnaissance des acides nucléiques du soi complexés ou de l'ADN mitochondrial. Il ne faut cependant pas se limiter à l'IFN de type I et aux TLR. En effet, les PDC ont aussi été impliquées dans la sclérodermie systémique avec la production de CXCL4 (405).

Une étude a démontré que des MP générées au cours de l'apoptose de polynucléaires neutrophiles pouvaient induire la production d'IFN-α par les PDC, de manière dépendante de leur contenu en ADN, en stimulant les TLR9 endosomaux. Bien que le mode de purification des MP de cette étude ne permette pas d'exclure la présence d'exosomes et d'agrégats protéiques/acides nucléiques (filtration 1-2 µm et ultracentrifugation 100000*g* (406)), elle suggère la possible implication d'autres véhicules d'acides nucléiques endogènes dans les maladies auto-immunes (407). Ce dernier point sera plus amplement abordé Ch III.IV.

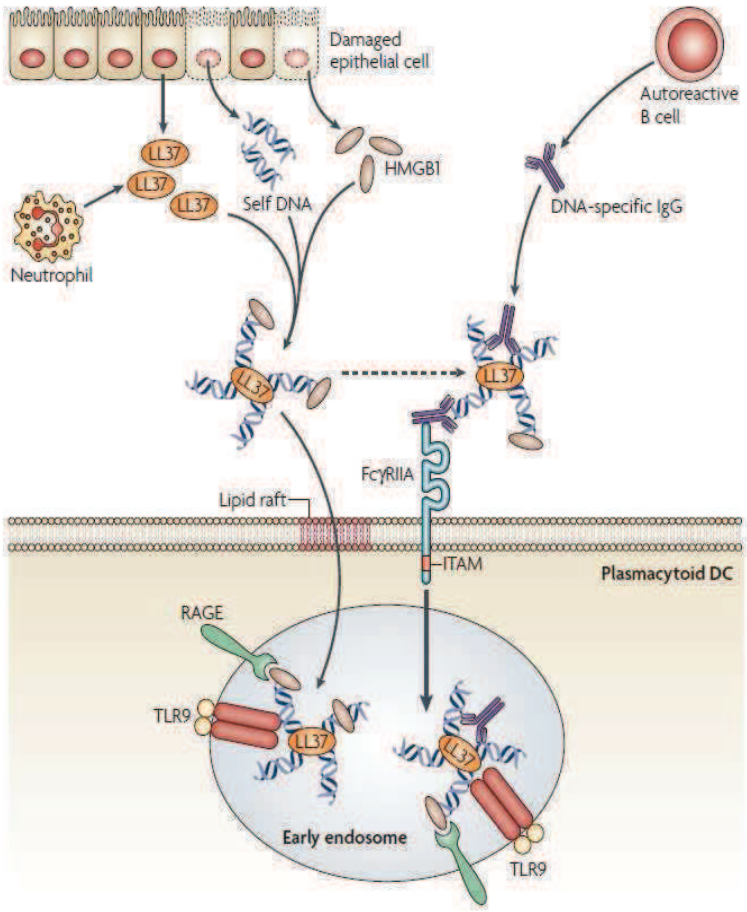


Figure 16 - Modèle de reconnaissance des acides nucléiques du soi par les PDC et engagement de la voie TLR9.
Le peptide antimicrobien LL37 est libéré lors de l'endommagement de l'épithélium ou par les polynucléaires neutrophiles infiltrant le site inflammatoire. Il peut se lier à l'ADN du soi libéré par les cellules mortes, formant des agrégats de structures condensées protégeant les acides nucléiques de la dégradation par les DNAses extracellulaires, et permettant leur capture par les PDC (possiblement *via* les radeaux lipidiques ?) permettant leur transport vers les endosomes précoces. La protéine nucléaire HMGB1 est également libérée dans le milieu extracellulaire par les cellules nécrotiques ou activées. Elle peut se lier à l'ADN agrégé en présence de LL37 (liaison préférentielle d'HMGB1 pour les structures d'ADN condensées), et promouvoir l'activation de la voie TLR9 par liaison avec son récepteur, RAGE. Dans le LES, des IgG autoréactifs anti-ADN natifs se lient aux complexes ADN/protéines, augmentant leur translocation dans les endosomes précoces par interaction avec les récepteurs FcγRIIA présents à leur surface des PDC. ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*. Adapté de la référence (303)

ii. Un autre exemple de pathologie chronique : L'Athérosclérose

Plusieurs études ont démontré une implication des PDC dans l'athérosclérose. Cette pathologie découle d'une dérégulation du métabolisme des lipides.

Une première étude dans des souris susceptibles à l'athérosclérose (les souris invalidées pour le LDLR, *Ldlr*$^{-/-}$) a montré que la déplétion des PDC augmentait la sévérité et la progression de la maladie (408). Ceci suggère un rôle protecteur des PDC dans l'athérosclérose. Des études ultérieures rapportent plutôt un rôle pro-athérogène des PDC. Il a été observé dans deux autres études utilisant un autre modèle d'athérosclérose (les souris invalidées pour ApoE, *ApoE*$^{-/-}$) que la déplétion des PDC diminuait l'incidence de la pathologie induite par une nourriture riche en lipides (409,410). L'étude de Döring a démontré la présence d'un infiltrat de PDC au niveau de plaques d'athérome humaines, ainsi que la présence du peptide LL37 (pouvant stimuler la sécrétion d'IFN-α par les PDC). Dans cette même étude, les auteurs ont rapporté une augmentation des taux d'auto-Ac anti-ADN dans les sérums de patients souffrant de sténoses carotidiennes symptomatiques par rapport aux taux sériques des patients présentant des sténoses carotidiennes asymptomatiques (410). Ceci suggère la possibilité d'activation des voies TLR dans les PDC au cours de l'athérosclérose, comme cela a été décrit dans les pathologies auto-immunes par les acides nucléaires complexés avec d'autres facteurs (voir ci-dessus).

En plus de la composante innée, les PDC pourraient aussi intervenir dans l'athérosclérose *via* leur capacité à activer les lymphocytes T. Il a été observé toujours dans l'étude décrite ci-dessus, que l'exposition des PDC humaines à des LDL oxydées (abondantes dans les plaques d'athérome et pouvant lier le CD36 exprimé par les PDC) entrainait une augmentation de la capacité des PDC à stimuler les lymphocytes T (410). L'augmentation de la prolifération des lymphocytes T dans les plaques d'athérome a été confirmée dans un modèle murin (*ApoE*$^{-/-}$) (409). De manière intéressante, une étude dans un modèle d'athérosclérose murin (*Ldlr*$^{-/-}$) a démontré que l'invalidation génique des PDC ou l'abrogation des capacités des PDC à présenter des Ag par les molécules du CMH de classe II, prévenait la formation de lésions athéromateuses avec une réduction des lymphocytes T CD4 Th1 pro-athérogènes (411). Chez l'homme, il a pu être observé que la stimulation par CpG d'explants de plaques d'athérome entrainait une forte production d'IFN-α, ainsi que l'expression de métalloprotéases MMP-9, l'augmentation du TLR4 à la surface des cDC et l'augmentation de TRAIL à la surface des LT CD4, pouvant induire la mort des cellules des muscles lisses (412,413).

L'implication des PDC est suggérée par la production d'IFN-α en réponse au CpG. Toutes ces données supportent un rôle des PDC dans l'athérosclérose (Figure 17).

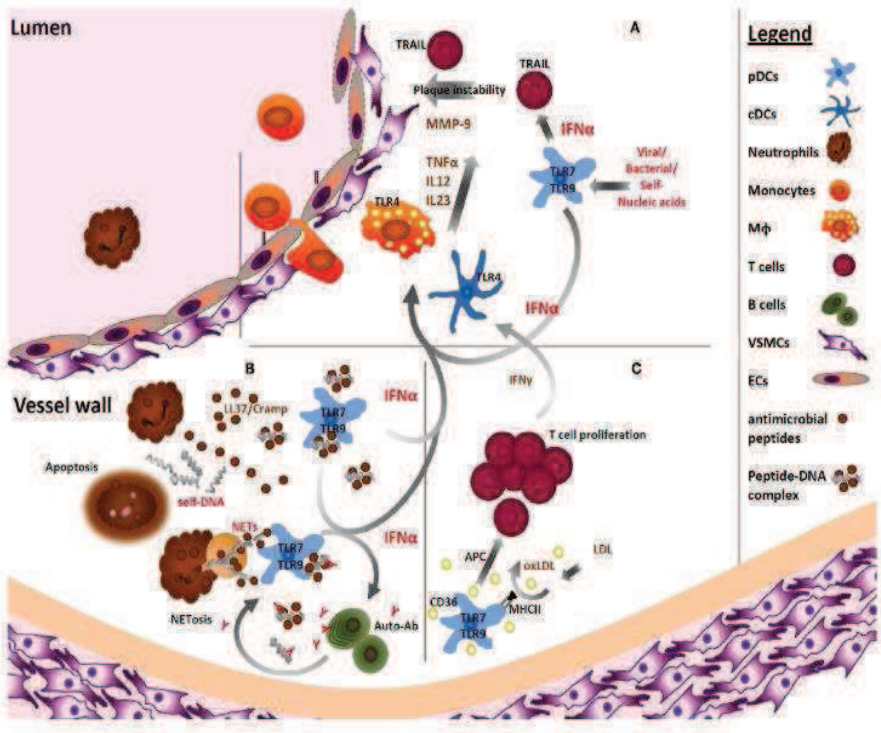


Figure 17 - Implication des PDC dans l'athérosclérose.
(A) Les PDC activées par des acides nucléiques présents dans la plaque d'athérome (acides nucléiques du soi ou acides nucléiques issus d'agents infectieux) *via* les voies TLR7/9 produisent une forte quantité d'IFN-α. Cette cytokine augmente l'expression de TLR4 sur les cDC et macrophages (Mφ), ainsi que celle de TRAIL à la surface des LT CD4, augmentant la cytotoxicité pour les cellules constituantes de la plaque, telles que les cellules endothéliales (EC), et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs). L'IFN-α active la production de cytokines inflammatoires (IL-12, TNF-α et IL-23) par les cDC et Mφ, ainsi que celle de métalloprotéases (MMP), dégradant la matrice extracellulaire et fragilisant la stabilité de la plaque d'athérome. (B) Le peptide antimicrobien LL37, sécrété par les polynucléaires neutrophiles infiltrants, se lie à des fragments d'ADN du soi provenant des cellules mourantes aboutissant à un complexe ADN/LL37 activant les PDC. L'IFN-α sécrété par les PDC activées, soutient la réponse immunitaire humorale permettant la commutation isotopique et la maturation des LB en plasmocytes sécréteurs d'auto-Ac. Ces auto-Ac pourront se lier à l'ADN formant des complexes auto-immuns, capables à leur tour de stimuler la production d'IFN-α par les PDC. (C) Des lipoprotéines modifiées (ex : oxLDL) se déposant dans les lésions athéromateuses peuvent activer les PDC après liaison du CD36, augmentant la capacité de ces cellules à induire une réponse lymphocytaire T se traduisant par la prolifération et la sécrétion de cytokines inflammatoires (principalement Th1). Adapté de la référence (414).

III. La contrepartie leucémique des cellules dendritiques plasmocytoïdes : La néoplasie à cellules dendritiques plasmocytoïdes ou BPDCN

1. Identification et caractérisation

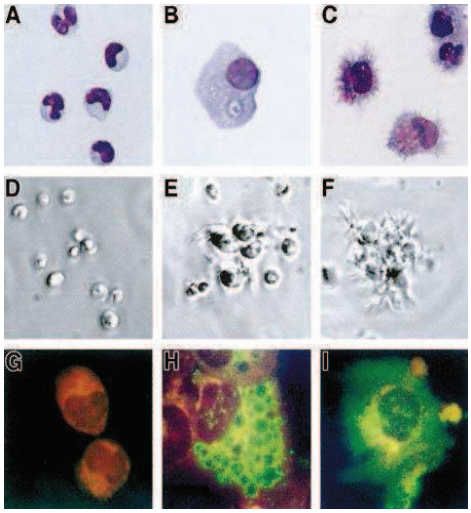


Figure 18 - Cellules dendritiques plasmocytoïdes leucémiques (LPDC) retrouvées dans la BPDCN : morphologie et activation IL-3.

(A) Morphologie de cellules LPDC issues d'un patient atteint de BPDCN (marquage May-Grünwald Giemsa). (B) Après 6 jours de culture en présence d'IL-3, les cellules acquièrent un cytoplasme large contenant des vacuoles. (C) L'ajout de CD40L les deux derniers jours de culture après 6 jours de culture avec de l'IL-3 induit une morphologie de type DC (présence de dendrites). (D) Les cellules leucémiques meurent en culture au bout de 6 jours. (E) La culture en présence d'IL-3 seul n'induit que peu/pas de dendrites, mais permet d'augmenter la survie des cellules. (F) Les cellules présentent un grand nombre de dendrites après culture en présence de CD40L. (D-F) Aspect en contraste de phase. (G) Le marqueur de maturation des DC CD83 n'est pas exprimé à la surface des cellules LPDC issues des patients, mais est exprimé après culture en présence d'IL-3 seul (H), et d'IL-3 + CD40L (I), observé par microscopie à fluorescence. Adapté de la référence (415).

Au milieu des années 1990, une nouvelle entité de leucémie a été identifiée (416). Les cellules malignes exprimaient les marqueurs CD56 et CD4, mais étaient négatives pour les marqueurs de lignée CD3, CD19, CD13 et CD33 (marqueurs conventionnels de la lignée myéloïde), d'où leur dénomination de cellules leucémiques NK (417–419). Ce n'est qu'en 2001 que les cellules leucémiques ont été identifiées comme dérivant des PDC, conférant à la leucémie sa dénomination actuelle de BPDCN (*Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm*) (415). Lors de cette étude, il a été démontré que les cellules issues de 7 patients exprimaient les marqueurs CD4, CD56 ainsi que CD123, ILT3, et HLA-DR. Par homologie avec les PDC, ces cellules présentent une augmentation de leur viabilité en présence d'IL-3 et GM-CSF en culture et acquierent une morphologie de DC mature après stimulation IL-3 et CD40L (Figure 18C et F). De plus, la culture des cellules en présence d'IL-3 et CD40L augmente l'expression du marqueur de maturation des DC, CD83 (Figure 18G-I), ainsi que celle des molécules de costimulation CD80/CD86, CD40, et des molécules HLA-DR et HLA-ABC de présentation de l'antigène. Une sécrétion d'IFN-α est observée pour la moitié des cellules leucémiques de patients, cultivées en présence de dérivés viraux. Les LPDC (PDC leucémiques) ont également montré après maturation (6 jours de culture en présence d'IL-3), leur capacité à activer et favoriser la différenciation des LT CD4 vers le profil Th2 (415). La même équipe a démontré que les LPDC exprimaient un panel de récepteurs aux chimiokines comparable à celui présenté par les PDC natives (CXCR3, CXCR4 et CCR7), ainsi que CCR6, permettant leur migration vers les sites tumoraux (nœuds lymphatiques et peau) (420). Il a été observé que 2/3 des patients atteints de

BPDCN étaient porteurs d'anomalies chromosomiques associées à des mutations au niveau génique (421). De manière intéressante, des études de profils d'expression génique ou GEP (*Gene Expression Profiling*) ont révélé une activation de la voie NF-κB, une augmentation des transcrits des gènes *bcl2* et *irf4* (associés à la survie et la prolifération cellulaire) (422), et une surexpression des oncogènes *hes6, runx2* et *flt3* (423).

Des différences phénotypiques (dont l'expression de CD56) et géniques entre les PDC et les cellules leucémiques LPDC ont cependant mis en doute l'origine cellulaire des LPDC. Plusieurs études ont rapporté l'expression du marqueur CD56 sur une population limitée de PDC (424,425). L'étude des sous-populations DC chez des individus sains a révélé une sous-population minoritaire de cellules (0,03% des PBMC) partageant des caractéristiques morphologiques et phénotypiques des PDC (expression de BDCA2, BDCA4 et production d'IFN-α après stimulation de la voie TLR9), mais également des caractéristiques de cDC (expression de CD2, CD13, et CD33) (426). Ces cellules montraient des caractéristiques de stimulation des lymphocytes T plus proches des cDC ; les facteurs de différenciation spécifiques des PDC (facteurs de transcription E2-2, SPIB) montraient quant à eux un profil d'expression intermédiaire. L'étude GEP semblait indiquer une plus grande proximité des LPDC avec ces cellules qu'avec des PDC natives (427).

2. Incidence Clinique

Le diagnostic de BPDCN a été réalisé pour des personnes d'âges différents et dans différentes localisations géographiques. La moyenne d'âge au diagnostic se situe à 67 ans, avec une prédominance pour les hommes (rapport homme/femme : 2,2-3/1), sans prédisposition ethnique. La BPDCN est une leucémie rare (<1% des leucémies aiguës) (428), avec une centaine de cas répertoriés en 2005, et une centaine de nouveaux cas décrits à l'heure actuelle dans la littérature (421). Cependant, sa description récente a longtemps rendu son diagnostic difficile. De nombreux cas pourraient faire l'objet d'un mauvais diagnostic.

i. Diagnostic

Les manifestations cliniques comprennent des lésions cutanées, des infiltrats sanguins, médullaires et des nœuds lymphatiques, ainsi qu'un envahissement possible des tissus périphériques (système nerveux central, poumon, foie). Un diagnostic de BPDCN peut être suspecté chez des patients âgés présentant des lésions cutanées persistantes, même peu évolutives. La biopsie de ces dernières présente de manière typique des infiltrats diffus et monomorphiques de blastes de taille moyenne présentant un noyau irrégulier avec une chromatine fine et au moins un nucléole de petite taille. Le

cytoplasme est peu important (rapport nucléo/cytoplasmique (RNC) : 0,8-0,9) et dépourvu de granulation. Une implication médullaire est courante avec des infiltrats diffus et des modifications dysplasiques dans le tissu hématopoïétique résiduel (Figure 19). La validation du diagnostic de BPDCN par immunophénotypage se base sur l'expression de CD4, CD45RA, CD56 et des marqueurs spécifiques de PDC CD123, TCL1 (*T-cell leukemia 1*), BDCA2 (CD303), BDCA4 (CD304), CD2AP, Spi-B. En 2009, une étude de notre équipe a proposé un algorithme pour favoriser le diagnostic impliquant la co-expression des marqueurs CD4, CD56, CD123, BDCA2 et/ou BDCA4 et l'absence d'expression des marqueurs « forts » de lignée CD3, CD11c, myélopéroxidase/MPO et CD79a (429). Une étude récente sur 91 cas de BPDCN a permis d'identifier l'expression des marqueurs CD4, CD56, CD123, CD303, et TCL1 comme les plus caractéristiques de BPDCN, la co-expression de 4 marqueurs serait suffisante au diagnostic (430). Il est à noter que les infiltrats médullaires sont observés dans 87% des cas (notamment dans les formes leucémiques avec la présence de blastes circulants), avec des taux variables (0-100%, médiane de 67%), ainsi qu'une cytopénie fréquente (91% des cas, dont thrombopénie [78%], anémie [65%], leuco/neutropénie [34%]) (431).

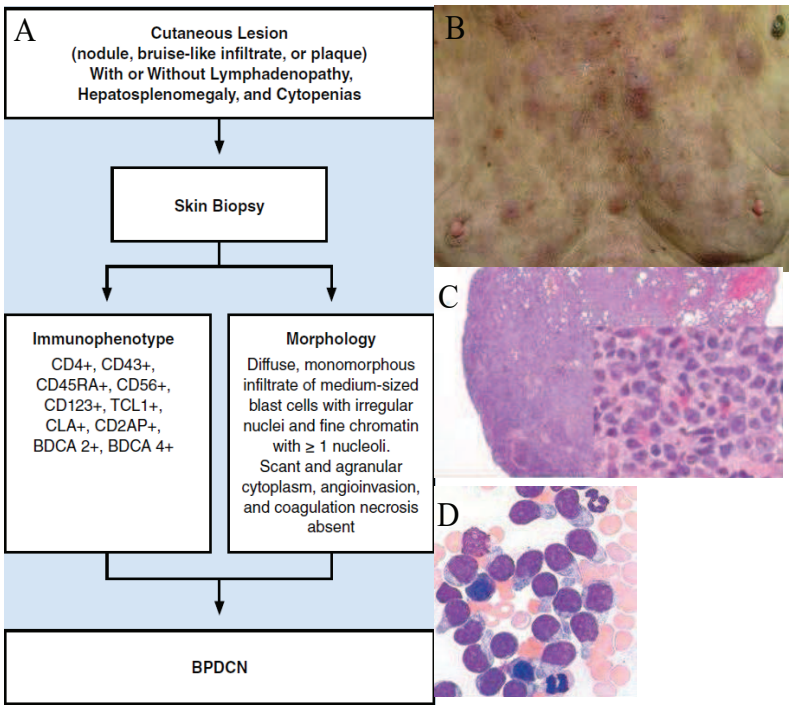


Figure 19 - Lésions cutanées et éléments pour le diagnostic.
A. Diagramme permettant de guider le diagnostic de BPDCN. B. Les patients montrent couramment des lésions cutanées persistantes. C. Une biopsie cutanée permet d'observer des infiltrats monomorphiques et diffus. D. La réalisation d'un myélogramme permet d'observer les infiltrats médulaires des cellules blastiques, présentant une chromatine immature fine, contenant ≥1 nucléole, une faible portion cytoplasmique plutôt basophile (D). Adapté de la référence (421)

ii. Prise en charge thérapeutique

La BPDCN est une hémopathie maligne de mauvais pronostic (médiane de survie : entre 12 et 16 mois) (430,432,433). A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur le protocole de prise en charge des patients. Il varie selon les centres et associe souvent des protocoles de chimiothérapies utilisés dans d'autres lymphomes/leucémies (431,434).

Dans le cadre de BPDCN avec des implications tissulaires limitées aux manifestations cutanées, des approches de thérapie ciblée comprenant une radiothérapie focalisée, un traitement par glucocorticoïdes par voie systémique ou une chimiothérapie non intensive peuvent montrer une efficacité initiale avec la résorption des lésions. Cependant, la plupart des patients rechutent en quelques mois. Cette approche est néanmoins une option palliative pour les patients non éligibles pour des thérapies plus agressives (435–437).

Récemment, une étude multicentrique incluant 43 patients souffrant de BPDCN a été réalisée comparant des traitements par protocoles associant des chimiothérapies de type LAM ou de type LAL/lymphome. Cette étude démontrait un avantage significatif du traitement de type LAL/lymphome avec une rémission complète permettant d'atteindre une médiane de survie allant jusqu'à 32,9 mois (438).

Une étude rétrospective incluant 34 patients présentant une BPDCN ayant reçu une allogreffe de cellules hématopoïétiques montrait à 3 ans : 32% de rechute, 33% de survie sans maladie et 41% de survie globale (439). Le faible nombre de cas rapportés ne permet cependant pas d'affirmer un gain de survie lié à cette immunothérapie adoptive allogénique (421).

3. Approches thérapeutiques

A l'heure actuelle, aucune thérapie ciblée n'existe. La meilleure caractérisation des LPDC/BPDCN a cependant permis plusieurs approches.

L'identification d'une mutation *FLT3-ITD* dans 3 cas de BPDCN sur 14, laisse envisager un effet thérapeutique intéressant des inhibiteurs de tyrosines kinases (438). Cette approche a déjà montré son efficacité dans le traitement de la LAM (440).

La caractérisation des LPDC a également révélé l'expression du récepteur de TRAIL (pour *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), DR5 dans 7 cas sur 9 testés, les rendant sensibles à une cytotoxicité délivrée par les cellules NK activées, TRAIL (441), ou un anticorps monoclonal agoniste

dirigé contre DR5, le Lexatumumab. L'utilisation d'activateur de la voie TRAIL a déjà été évaluée en tant que traitement anti-cancer dans des études précliniques démontrant une bonne tolérance, mais des bénéfices limités dans les modèles étudiés (442).

Sapienza et ses collègues ont identifié en 2014 une activation aberrante de la voie NF-κB dans les LPDC. Le traitement des cellules en culture par du bortézomib (un inhibiteur du protéasome, inhibant l'activation de NF-κB), ainsi qu'un inhibiteur spécifique de NF-κB avait permis de démontrer un effet antiprolifératif et cytotoxique sur les LPDC (422).

Une molécule de fusion couplant l'IL-3 à la toxine diphtérique, SL401, a montré son efficacité *in vitro* sur des cellules leucémiques BPDCN, *in vivo* dans un modèle de xénogreffe chez la souris ainsi que dans une étude clinique de phase I/II (443,444). Cette molécule SL401 est internalisée par les LPDC après liaison avec le CD123 (chaine α du récepteur à l'IL-3) et le CD131 (chaine β du récepteur à l'IL-3, commune à d'autres cytokines). La partie toxine diphtérique inhibe la synthèse protéique, entrainant la mort des cellules blastiques. Dans cette étude, Frankel et son équipe ont traité 11 patients souffrant de BPDCN à une posologie journalière de 12,5 µg/kg pendant 5 jours. Une réponse au traitement a été observée chez 78% des patients (n=6/9) durant le premier cycle de traitement (médiane de réponse de 5 mois) (443).

D'autres approches ciblant CD123, fortement exprimé sur les LPDC, sont à l'étude dans d'autres hémopathies, telles que la LAM et la LMC (Leucémie Myéloïde Chronique). Parmi ces dernières, il a été étudié l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre le CD123 et modifié pour augmenter l'affinité du fragment Fc avec le CD16. Cet anticorps empêche la liaison de l'IL-3 (et donc la prolifération induite par ce dernier) et induit une forte cytotoxicité cellulaire dépendante de l'Ac (ADCC) impliquant les cellules NK. L'injection chez l'animal de cet anticorps a révélé un retard de survenu de la leucémie chez la souris, et une déplétion des cellules CD123+ dans un modèle de primate non humain (445,446).

Enfin, une dernière approche pouvant s'appliquer potentiellement à la BPDCN est la génération de lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique à l'antigène (CAR pour *chimeric antigen receptor*), dirigé contre le CD123, permettant le ciblages des cellules LPDC (447,448).

La réponse limitée aux protocoles de chimiothérapies, la survie réduite après les traitements et la rechute fréquente (même après allogreffe de cellules hématopoïétiques) montrent la nécessité de développer d'autres approches thérapeutiques pour la BPDCN.

Chapitre III. Les Microparticules

I. Généralités

1. Historique

En 1967, dans son étude intitulée *"The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma"* (publiée dans le *"British Journal of Haematology"*), Peter Wolf décrivait pour la première fois des **débris plaquettaires** responsables de la coagulation de plasma, sérum, et fractions dérivées à partir de la sédimentation de particules issus du plasma (distincts des plaquettes) (449). Il démontra que le temps de coagulation du plasma était augmenté par ultracentrifugation à 134211*g*, confirmant ainsi la découverte de Chargaff et West faite vingt ans plus tôt (450). De plus, Wolf observa que lors du stockage de plasma citraté riche en plaquettes, son activité coagulante était augmentée ainsi que le nombre de débris plaquettaires en fonction du temps. Il attribua ce gain d'activité aux débris plaquettaires, élargissant la théorie de l'augmentation de l'activité des plaquettes par le stockage précédemment énoncée (451). En 1970, Webber et Johnson démontrèrent que l'activation des plaquettes par ajout de thrombine au plasma induisait la formation de vésicules englobant les granules alpha de ces dernières (contenant des facteurs coagulant) et donc la production de « débris plaquettaires » plutôt qualifiées alors de vésicules plaquettaires (452). L'année suivante, Crawford démontra que ces vésicules alors nommées microparticules plaquettaires (PMP) possédaient une activité ATP-ase, et contenaient du cholestérol et des phospholipides (453). Par l'utilisation d'une immunoélectrophorèse faisant appel à des anticorps dirigés contre les complexes de glycoprotéine IIb/IIIa présents à la membrane plaquettaire, James Georges et ses collègues réussirent en 1982 à compter les PMP et à démontrer la présence de microparticules (MP) d'origine cellulaire distincte dans le plasma humain de sujet sain (454). Les décennies suivantes ont permis de confirmer la présence de MP plasmatiques ou générées *in vitro* après activation, de diverses origines cellulaires, dont des cellules tumorales (455), ou des monocytes après stimulation par le LPS (456). Il faut noter que ces MP générées dans des circonstances pathologiques ou inflammatoires montrent une expression augmentée du facteur tissulaire (TF) et des phosphatidylsérines (PS), associée à une activité pro-coagulante accrue. Ces facteurs ont été impliqués dans différentes pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète de type II, le syndrome de détresse respiratoire aigüe ou encore certains cancers (457–460).

Depuis ces premières études, le nombre de travaux sur les microparticules n'a cessé d'augmenter faisant apparaitre la nécessité d'une caractérisation des différentes vésicules observées. Ces vésicules sont regroupées sous le terme de vésicules extracellulaires (*extracellular vesicle*, EV en anglais) et sont l'objet d'intenses débats dans la communauté scientifique. Ces vésicules pourraient être réparties en 3 groupes : les exosomes ; les microparticules, microvésicules ou ectosomes ; les corps apoptotiques (461) .

2. Caractérisation et nomenclature

En 2005, La Société Internationale de Thrombose et d'Hémostase (ISTH pour *« International Society on Thrombosis and Haemostasis »*) a défini les microparticules (MPs) comme des vésicules dérivées de cellules, de taille comprise entre 0,1 et 1 µm, ne possédant pas de noyaux et d'activité transcriptionnelle, pouvant contenir des protéines du cytosquelette et présenter à leur surface les protéines membranaires spécifiques à leur cellule d'origine, ainsi qu'exprimer des phosphatidylsérines (462). Ces phospholipides sont localisés préférentiellement au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique et exposés de manière contrôlée et limitée à la surface des cellules vivantes. Dans la littérature, les termes « microvésicules » ou « ectosomes » sont couramment utilisés pour désigner les microparticules. Les autres vésicules circulantes identifiées présentes des caractéristiques distinctes quant à leur taille et leur composition (Tableau 5). Cependant, la disparité des protocoles d'isolement et des techniques d'étude n'exclut pas une hétérogénéité des préparations de ces vésicules, mais ne peut certifier que d'un enrichissement en un type donné. De plus, les contamiants potenciels dépendent du milieu (fluide biologique ou milieu de culture) d'origine des microparticules (461).

Tableau 5 – Principales caractéristiques physicochimiques des vésicules extracellulaires.

Caractéristiques	Exosomes	Microparticules	Corps Apoptotiques
Taille (diamètre)	0,03-0,1 µm	0,1-1 µm	1-5 µm
Origine cellulaire	Corps multivésiculaires (organites intracellulaires : endosomes,…)	Membrane plasmique	« fusion » des membranes internes et de la membrane plasmique, translocation de matériels nucléaires (463–465)
Composition lipidique	Cholestérol, sphingomyéline, céramide, (PS)	Membrane plasmique PS	Fragments cellulaires PS
Principaux marqueurs de détection	Tétraspanines (CD9, CD63)	Protéines membranaires de la cellule d'origine, Intégrines, sélectines	PS, fragments d'ADN, Histones
Sédimentation (valeurs utilisées dans la littérature)	100 000*g*-200 000*g*	≈20 000*g*	800-110000*g*
Méthodes de détection	TRPS, NTA, Microscopie électronique, Western blot, Spectrométrie de masse	TRPS, NTA, Cytométrie en flux, Immuno-capture	Cytométrie en flux
Mécanismes de production	Activation cellulaire	Activation cellulaire et phase précoce de l'apoptose	Phase tardive de l'apoptose
Références	(466–468)	(22,23)	(471,472)

Abréviations : PS : Phosphatidylsérines ; TRPS : tunable resistive pulse sensing, NTA : nanoparticle tracking analysis. Adapté de la référence (473–475).

3. Formation des microparticules

Les premières études portant sur la formation des microparticules se sont intéressées au mécanisme d'exposition des PS. A l'état basal, la bicouche lipidique présente une répartition asymétrique de lipides impliquant l'activité de plusieurs enzymes nommées floppase (transporteur des lipides vers la face externe), flippase (transporteur des lipides vers la face interne), et scramblase (favorisant un arrangement aléatoire). L'exposition des PS au feuillet externe de la membrane plasmique est la conséquence de l'activation ou de l'apoptose cellulaire (476). Il en résulte la translocation par les floppases (477) et l'inhibition des flippases par l'augmentation en calcium intracellulaire (478). Cette modification de l'équilibre des phospholipides entre les deux couches membranaires, ainsi que la protéolyse du cytosquelette par l'action des calpaïnes activées par le calcium conduit à la libération des MP (479). L'inhibition des calpaïnes dans les plaquettes a été observée comme diminuant la formation de PMP (480). Lors de cette même étude (480), il a été observé que l'inhibition de la caspase-3 contenue dans les plaquettes diminuait fortement la production de MP de manière

indépendante de la calpaïne. La formation de MP par activation des caspases a été démontrée comme impliquant plusieurs mécanismes. L'activation de la caspase-3 entraine le clivage de la kinase ROCK I (*Rho-associated kinase I*), produisant une forme constitutivement active de cette dernière (481,482). Cette enzyme est impliquée dans le réarrangement du cytosquelette dépendant entre autres de la phosphorylation de MLC (*myosin regulatory light chain*) qui a été décrite comme indispensable au bourgeonnement membranaire (483). Un mécanisme analogue a été observé faisant intervenir l'activation de la caspase-2 entrainant le clivage de ROCK II (484). Plus récemment, un mécanisme impliquant la caspase-1 et la calpaïne a été démontré comme pouvant induire la libération de MP par des macrophages (485), (Figure 20). Il est important de signaler que les plaquettes ne possédant pas de noyau cellulaire ne peuvent pas subir d'« apoptose » au sens strict du terme. De même, la caspase-1 est impliquée dans une mort inflammatoire de la cellule associée à l'activation de l'inflammasome et appelée pyroptose (204).

Les signaux d'activation induisant la formation de MP sont nombreux et dépendent du type cellulaire. Ces derniers comprennent des signaux inflammatoires endogènes ou exogènes (comme le LPS (456)), ainsi que physiologiques (ex :apoptose). Pour une même cellule, la composition des MP est grandement dépendante du signal d'induction, comme cela a été observé pour les MP dérivées de paquettes (486), ou de cellules endothéliales (487). Il a également été observé des MP n'exposant pas la PS (488), suggérant d'autres mécanismes d'induction.

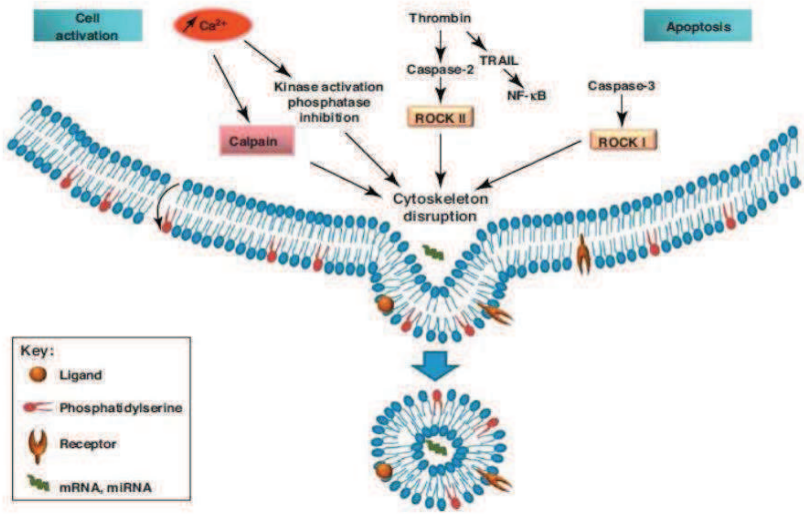


Figure 20 - Schéma illustrant les différentes étapes de formation des microparticules.
Durant l'activation cellulaire, une augmentation du calcium intracellulaire induit l'externalisation des phosphatidylsérines. L'augmentation du calcium est également associée avec l'activation des calpaïnes, ce qui est requis pour le remodelage du cytosquelette et la formation de microparticules (MP). L'induction d'apoptose, médiée par le clivage des caspases, induit l'activation des protéines ROCK, entrainant une altération du cytosquelette et le bourgeonnement membranaire. Abréviations: ROCK, *Rho Kinase* ; TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Adapté de la référence (489)

4. Clairance des microparticules

Les mécanismes de clairance des MP sont encore mal définis. L'homologie entre les corps apoptotiques et les MP (vésicules dérivées de cellules, pouvant être induites lors de l'apoptose cellulaire et exposant des PS) a conduit à l'investigation du rôle de la PS dans la prise en charge des MP par les cellules de l'organisme. La lactadhérine (aussi appelée MFGE-8 pour *milk fat globule epidermal growth factor-8*) est une molécule se fixant aux PS, faisant office de protéine de pontage avec l'intégrine αvβ5 à la surface des phagocytes (490). Il a été observé que la lactadhérine pouvait se lier aux PMP et augmentait la prise en charge *in vitro* de ces MP par des macrophages. Des souris invalidées pour la lactadhérine présentaient une augmentation de leur taux de MP circulantes (491). La même équipe a démontré plus tard l'implication d'une autre protéine de pontage des PS avec les intégrines des phagocytes, la protéine Del-1 (pour *developmental endothelial locus-1*) (492). L'opsonisation par les fractions du complément s'est révélée quant à elle indispensable à l'internalisation de MP issues de lignées de carcinome ou de fibroblastes humains par les lymphocytes B. Cependant, les monocytes ne montrent qu'une dépendance partielle à ce mécanisme. Il a été observé que les monocytes expriment à leur surface la molécule d'annexine V, permettant la liaison aux PS exprimées par les MP, et l'internalisation de ces dernières (493). Une étude sur la prise en charge d'ectosomes par des macrophages a démontré une implication du récepteur Mertk, capable de se lier aux PS par les molécules de pontage, GAS6 ou Protéine S (494). Ce récepteur, appartenant à la famille des TAM (Tyro3, Axl, Mertk), est connu pour son implication dans la prise en charge des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires et l'induction d'une réponse tolérogène (46). Cependant, les études impliquant des molécules de pontages (GAS6 et Protéine S) et ces récepteurs TAM dans la prise en charge des MP restent peu nombreuses.

La reconnaissance de la PS par les récepteurs membranaires des phagocytes est considérée parmi les premiers signaux nécessaires à la phagocytose (495). Une étude sur l'internalisation des MP endothéliales (EMP) par des PDC a démontré l'implication d'un mécanisme de phagocytose (inhibition par la cytochalasine D), ainsi que de macropinocytose (inhibition par l'amiloride) (327). Ces résultats ont été confirmés par la suite sur l'internalisation de PMP par des cellules endothéliales cérébrales (496). Des mécanismes de fusion des MP avec les membranes cellulaires ont également été suggérés (473). La prise en charge des MP permet donc un transfert horisontal du matériel cellulaire (depuis la cellule d'origine de la MP vers la cellule prenant en charge la MP).

II. Composition des microparticules

La composition des MP est directement liée à leur cellule d'origine, ainsi qu'au mécanisme de formation dont elles sont issues (activation ou apoptose). Elles sont composées d'un large spectre de molécules bioactives, de molécules d'adhérence et d'ancrage à la matrice extracellulaire et aux membranes cellulaires, leur permettant des interactions spécifiques avec différents types cellulaires. Après prise en charge par les « cellules cibles », les MP ont la capacité de moduler les fonctions de ces dernières en leur délivrant leur matériel bioactif.

1. Les composés membranaires

Les composés membranaires présents à la surface des MP sont issus de la cellule d'origine, permettant donc l'identification de l'origine de la MP par immunomarquage (Tableau 6).

Tableau 6 Principaux marqueurs d'identification des origines cellulaires des MP.
La liste a été limitée aux marqueurs les plus utilisés. Adapté de la référence (497)

Microparticules	Cellule d'origine	Cibles antigéniques de surface
PMP	Plaquettes	CD31, CD40L, CD41, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, fibrinogène, VWF
MegMP	Mégacaryocytes	CD41, CD184, Filamine A
EMP	Cellules endothéliales	CD31, CD34, CD51, CD54, CD62E, CD63, CD105, CD106, CD142, CD144, CD146
MMP	Monocytes	CD14, CD142, CD144, CD162
LyMP	Lymphocytes	CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20, CD45, CD66b
NMP	Neutrophiles	CD11a, CD11b, CD15, CD16, CD35, CD49, CD59, CD62L, CD66b, CD142
ErMP	Erythrocytes	CD35, CD235a

Abréviations : MP, Microparticles ; EMP (*Endothelial cells derived Microparticles)* : MP endothéliales ; MMP (*Monocytes derived Microparticles)* : MP monocytaires ; LyMP (*Lymphocyte derived Microparticles)* : MP lymphocytaires ; NMP *(Neutrophil cells derived Microparticles)* : MP dérivant des polynucléaires neutrophiles ; ErMP *(Erythrocytes derived Microparticles)* : MP Erythrocytaires.

Ces composés peuvent également exercer une fonction et procurer une activité propre aux MP, ou transférer cette activité à la cellule cible. Par exemple, l'exposition des PS sur la couche externe des membranes des MP forme une plateforme d'initiation de la coagulation (498–500). Le transfert du récepteur CCR5 à des PBMC ne l'exprimant pas a été démontré comme entrainant son expression à la surface des cellules cibles. Ce même résultat a été observé pour CXCR4 *via* des MP dérivées de cellules de la lignée mégacaryocytaire, rendant les cellules cibles sujettes à une infection par le virus de l'immunodéficience humaine VIH-1 (CXCR4 et CCR5 étant des corécepteurs au tropisme de souches de VIH) (501,502). Il a également été observé que l'incorporation de PMP portant le CXCR4 par des cellules angiogéniques EOC (pour *early outgrowth cells*) augmentait l'activation d'AKT par le ligand de CXCR4, CXCL12 dans ces cellules. Ceci favorisait la régénération vasculaire après lésions (503). L'augmentation de l'expression de CXCR4 par les cellules cibles peut également être induite par le transfert de la sphingosine-1-phosphate ou de CCL5, qui sont connus pour induire l'expression de CXCR4 (504,505). Ce transfert peut également avoir des effets délétères dans des contextes pathologiques comme les cancers. Il a été observé que des MP dérivées de cellules de glioblastomes agressifs pouvaient transférer un récepteur à l'EGF tronqué (EGFRvIII) à d'autres cellules cancéreuses exprimant la forme sauvage, transmettant ainsi leur agressivité (506). D'autres fonctions peuvent être transférées entre les cellules, pouvant impliquer des protéines intra-particulaires.

2. Protéines intra-particulaires

Ces protéines peuvent être des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance ou de transcription. Il a été observé dans plusieurs études que la cytokine inflammatoire IL-1β était fortement sécrétée sous forme empaquetée dans les MP (507–509). De manière similaire, l'activation de plaquettes a démontré la sécrétion de MP contenant des granules α, dont la chimiokine CCL5 qui pourra par ce moyen être transférée à la surface de l'endothélium afin de promouvoir le recrutement monocytaire. De manière intéressante, ces auteurs ont démontré que le blocage ou l'invalidation de la sélectine P, GPIb, ainsi que GPIIb/IIIa et la molécule d'adhérence jonctionnelle A inhibaient le transfert de CCL5 aux cellules endothéliales révélant un mécanisme de contrôle de la localisation et du contexte de transfert (510). Les PMP ont également été caractérisées comme pouvant contenir des récepteurs nucléaires fonctionnels pour leur activité de transcription (PPARγ/RXR), ou des facteurs de croissance possédant un effet pro-angiogénique, tels que le facteur de croissance endothélial VEGF, fibroblastique bFGF, et plaquettaire PDGF. Ces derniers ont été observés comme participant à la croissance endothéliale *in vitro* et à la génération de nouveaux vaisseaux par leur injection chez

la souris, après une ischémie cardiaque (511,512). Les macrophages alvéolaires sont aussi capables de transférer *via* les MP des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, comme les protéines SOCS (pour *suppressor of cytokine signaling*). Ces protéines vont pouvoir inhiber les STAT des cellules épithéliales alvéolaires après internalisation des MP (439). Ce mode de transfert hautement régulé n'est cependant pas généralisé. Des MP dérivées de cellules cancéreuses contenant l'activateur de métalloprotéinase de la matrice extracellulaire EMMPRIN (CD147), ont été observées comme libèrant leur contenu dans l'environnement tumoral suite à une dégradation de la MP causée par le pH acide de l'environnement (513). Ce mécanisme a été confirmé *in vitro* avec des MP contenant du VEGF (514).

3. Acides nucléiques

En plus de la modification de l'activité transcriptionnelle de la cellule cible par des facteurs de croissance ou la stimulation de récepteurs nucléaires, la régulation de la transcription des cellules cibles par les MP peut également être assurée par transfert d'ARN messagers (ARNm) ou de micro-ARN (miARN).

Cette modification de la transcription est un mécanisme important du renouvellement tissulaire. En utilisant des MP contenant de l'ARNm codant pour une protéine marquée à la GFP, il a été observé que des cellules endothéliales pouvaient intégrer et traduire l'information génique. Des cellules endothéliales progénitrices généraient des MP contenant de l'ARNm, permettant d'induire l'organisation capillaire *in vitro* de cellules endothéliales et favorisant *in vivo* l'angiogenèse. Le traitement par RNAse inhibait ces effets. L'analyse de ces ARNm a révélé un profil spécifique permettant l'activation de la voie PI3K/Akt (515). L'ARNm transporté par des MP dérivées de différentes cellules n'est pas incorporé de manière aléatoire dans la MP. Il a été proposé que ce mécanisme de sélection implique des ribonucléoprotéines, responsables du trafic intracellulaire de l'ARN et présentes dans les MP (515–517). En plus des ARNm, les MP peuvent contenir des miARN. Ces derniers sont composés de courtes séquences nucléotidiques (21 à 24 nucléotides), non codantes, pouvant réguler l'expression génique par inhibition de la transcription et/ou dégradation d'ARNm spécifiques. Ils sont impliqués dans la régulation de processus, tels que l'hématopoïèse dans des circonstances physiologiques, mais aussi pathologiques, comme l'athérosclérose (518,519). Il a été observé que des MP générées lors de l'apoptose de cellules endothéliales au cours de la progression de l'athérosclérose étaient enrichies en miARN-126 qui induisait la sécrétion de CXCL12 par les cellules cibles (prenant en charge les MP), délivrant ainsi un effet athéro-protecteur

(520). Les MP peuvent donc modifier les fonctions de cellules cibles par transfert d'acides nucléiques.

4. Composés lipidiques

Les MP étant issues de la membrane plasmique, elles sont composées en partie de phospholipides ainsi que de cholestérol, dont la concentration est augmentée dans les radeaux lipidiques. Outre l'implication fonctionnelle de la PS décrite ci-dessus (pro-coagulante, prise en charge des MP, engagement de la signalisation de ses récepteurs directement ou par l'intermédiaire d'une molécule de pontage), ces éléments possèdent des propriétés bioactives. Dans l'absolu, en faisant le parallèle avec les cellules ou les corps apoptotiques qui expriment les PS et engagent les récepteurs aux PS, certains de ces récepteurs sont couplés à la production de molécules immunosuppressives telles que le TGF-β par le récepteur stabiline-2 (521).

Il a été observé que la composition en phospholipides et cholestérol des PMP était différente de celle des membranes plaquettaires. Ceci suggère une sélectivité de la composition lipidique des MP. Les PMP montraient une composition intermédiaire entre la membrane des granules et la membrane plasmique des plaquettes. Un enrichissement en cholestérol suggérait une forte présence de radeaux lipidiques. Enfin, dans cette même étude, la composition lipidique des PMP était dépendante du traitement activateur à l'origine de la production de MP à partir des plaquettes (522). Une étude précédente avait démontré une modification de la composition lipidique de microvésicules dérivées de plaquettes en fonction du stockage (523). La présence d'acide arachidonique (AA) dans les PMP a été démontrée comme responsable de l'augmentation de l'adhérence intercellulaire des cellules endothéliales et monocytes, *via* l'induction de la molécule ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*) sur les cellules endothéliales, LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) et Mac-1 (*Macrophage antigen-1*) sur les monocytes. Cet effet était reproduit en utilisant de l'acide arachidonique isolé des MP (524). L'activation des polynucléaires neutrophiles par des endotoxines induit la production de MP contenant des lipides bioactifs. Ces MP ont été observées comme responsables de la sécrétion de PAF (*platelet-activating factor*) par les neutrophiles, un médiateur lipidique impliqué dans l'inflammation et la thrombose, responsable de l'activation des plaquettes (525). La caractérisation du contenu lipidique des MP dérivées de neutrophiles a démontré la présence de précurseurs des résolvines permettant, après prise en charge par les macrophages, d'augmenter la production de résolvine D2 et E2 (526). Les MP selon leur origine peuvent donc contenir des médiateurs lipidiques inflammatoires (PAF, acide arachidonique) ou anti-inflammatoires (résolvines).

Des exemples de ces molécules bioactives identifiées dans les MP sont cités dans le Tableau 7 ci-dessous, afin de mieux apprécier la disparité des cellules d'origine ainsi que des cibles cellulaires.

Tableau 7 - Molécules bioactives transférées par les microparticules.
Seuls quelques exemples représentatifs de l'hétérogénéité des molécules véhiculées sont représentés ici. La liste n'est très certainement pas exhaustive.

Matériel transféré	Cellules		Référence(s)
	Origine des MP	Cible cellulaire	
Récepteurs/protéines de surface			
CCR5	PBMC	Diverses	(56)
CXCR4	Plaquettes (Plt)	Diverses	(501,502)
	Plt	EOC	(503)
GPIIb/IIIa	Plt	Neutrophiles	(527)
	Plt	EOC	(528)
EGFR	Tumorale	Diverses	(506)
CMH	cellules immunes	cellules immunes	(529,530)
TF	Monocytes	Plt	(531)
Protéines intra-particulaires			
Cytokines/chimiokines			
IL-1β	Diverses	Diverses	(507–509,532)
RANTES/CCL5	Plt	Endothéliales	(510)
Facteurs de croissance			
VEGF	Plt	Endothéliales	(511,512)
	Tumorale	Endothéliales	(514)
bFGF	Plt/Tumorale	Endothéliales	(511,512)
PDGF	Plt	Endothéliales	(512)
Protéases			
MMP	Tumorale	MEC	(514)
EMMPRIN	Tumorale	MEC	(513)
Caspase-1	Monocytes	SMCs	(533)
Récepteur nucléaire			
PPARγ	Plt	Monocytes	(534)
Molécules de signalisation			
SOCS	macrophages	Cellules épithéliales	(439)
Acides nucléiques			
ARNm	Diverses	Diverses	(515,517)
miARN	Diverses	Diverses	(516,520,535,536)
Lipides			
PS	Diverses	Diverses	(479,498,500,537)
AA	Plt	Diverses	(524)
PAF	Diverses	Plt et autres	(525)
Cholestérol	Diverses	Diverses	(523),(522)
Pro-résolvines	Neutrophiles	Macrophages	(526)

Abréviations : **CCR,** ***Récepteur aux chimiokine à motif C-C ;*** **CXCR,** ***Récepteur aux chimiokine à motif C-X-C ;*** **EGFR,** ***Récepteur au facteur de croissance endothélial (Endothelial Growth Factor Receptor) ;*** **CMH,** ***Complexe Majeur d'Histocompatibilité ;*** **TF,** ***Facteur Tissulaire (Tissue factor) ;*** **RANTES** ***(Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted) ;*** **CCL,** ***chimiokine à motif C-C ;*** **PS,** ***Phosphatidylsérines ;*** **AA,** ***Acide Arachidonique ;*** **PAF,** ***Facteur d'activation plaquettaire (platelet activating factor) ;*** **PBMC,** ***Cellules mononucléées du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells) ;*** **MEC,** ***Matrice Extra Cellulaire ;*** **Plt,** ***Plaquettes ;*** **EOC,** ***(Early Outgrowth Cells) ;*** **SMC,** ***Cellules de muscle lisses (Smooth Muscle cells).*** **Adapté des références (503) et (538).**

III. Microparticules et pathologies inflammatoires

Etant donné leur composition complexe à l'origine de fonctions variées, les MP ont été très étudiées pour leur implication dans les processus physiologiques (ex : homéostasie tissulaire (511,512), défense de l'organisme (539), régulation de la coagulation….) et pathologiques (ex : inflammation, thrombose…). Le potentiel pathologique des MP est lié à leur contenu et capacité à initier et entretenir une réponse inflammatoire. L'initiation de la réponse inflammatoire a été décrite comme induite par la reconnaissance de motifs moléculaires associés à des pathogènes (PAMP) ou aux dommages des tissus de l'organisme (DAMP). Ces motifs moléculaires peuvent être délivrés sous forme de vésicules extracellulaires, dont les MP. Il a par exemple été observé que des bactéries pouvaient sécréter des vésicules extracellulaires contenant des facteurs de virulence ou des motifs reconnaissables par des récepteurs de l'immunité innée : les TLRs (*Toll Like Receptors*) (539,540). Les DAMP associés aux vésicules extracellulaires sont nombreux et peuvent initier et entretenir une réponse inflammatoire. C'est le cas pour les vésicules issues de l'apoptose cellulaire contenant des acides nucléiques (407). Ces DAMP pourront initier une réponse inflammatoire directement après reconnaissance par les cellules immunitaires, ou former des complexes immuns après reconnaissance par des anticorps (541). Ces DAMP pourront avec les cytokines inflammatoires entretenir une réponse immune pouvant déboucher à une inflammation chronique et une circonstance pathologique. Pour illustrer la complexité de la distinction des différents types de vésicules extracellulaires, citons un travail où l'activité IL-1α est retrouvée plutôt au niveau des corps apoptotiques issus des cellules endothéliales stressées que des MP dérivées des mêmes cellules endothéliales apoptotiques (542). Une évolution du taux de MP dans différents prélèvements biologiques a été révélée dans des circonstances pathologiques diverses (Tableau 8).

Tableau 8 - Pathologies pour lesquelles le nombre de MP est modifié au niveau sanguin ou dans d'autres liquides biologiques (le liquide céphalorachidien, LCR). La liste n'est certainement pas exhaustive.

Pathologies	Phénotype MP	Prélèvement	Niveau	Référence
Syndrome coronarien aiguë	PMP, EMP	Sang	↑	(543,544)
Insuffisance cardiaque congestive	EMP	Sang	↑	(545)
Attaque ischémique	PMP, EMP	Sang	↑	(546,547)
Maladie artérielle périphérique	PMP	Sang	↑	(548)
Athérosclérose	LMP, PMP, EMP, EryMP	Sang, plaques	↑	(549–553) (554,555)
Thromboembolie veineuse	EMP	Sang	↑	(556)
Diabète de type 1	PMP, EMP	Sang	↑	(557)
Rétinopathie Diabétique	PMP, EMP, PtrMP, MGMP		↑	
Pré-éclampsie	PMP, EMP, LMP, EryMP	Sang	↑	(558)
Vascularite	PMP, EMP, LMP	Sang	↑	(559–561)
Lupus Erythémateux Systémique	PMP, EMP, LMP	Sang	↑ et ↓	(562–565)
Psoriasis	PMP, EMP, LMP	Sang	↑ et ↓*	(566–568)
Polyarthrite Rhumatoïde	PMP, LMP, MonoMP	Liquide Synovial ; Sang	↑	(541,563,565,569–572)
Syndrome des antiphospholipides	PMP, EMP	Sang	↑	(573,574)
Sepsis	PMP, EMP, LMP	Sang	↑	(575)
Schizophrénie	EMP, LMP	LCR	↑	(576)
Sclérose amyotrophique latérale	EMP, LMP	LCR	↑	(467)
Cancers variés	PMP, TMP, $TF^{+}MP$	Sang	↑	(577,578)
Syndrome de Sjögren	PMP, LMP	Sang	↑	(563)
Sclérodermie	PMP, EMP, LMP	Sang	↑	(579)
Thrombopénie induite par l'héparine	PMP	Sang	↑	(580)

Abréviations : ***signifie après traitement.* EMP *(Endothelial cell derived MP) ;* PMP *(Platelet derived MP) : Microparticules plaquettaires ;* EryMP *(Erythrocytes derived MP) :* Microparticules dérivées des Erythrocytes *;* PtrMP *(Photoreceptor derived MP) :* Microparticules dérivées des photorécepteurs*;* MGMP *(Microgderived MP) :* Mocroparticules dérivées de la microglie *;* LMP *(Leukocyte derived MP) :* Microparticules leucocytaires. TMP *(Tumor derived MP) :* Microparticules Tumorales.

1. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi artérielle qui se caractérise par la formation d'une plaque d'athérome. Cette dernière a une composition qui évolue au cours du développement de la maladie. Le processus de formation est largement décrit comme étant dû à un fort taux sanguin de cholestérol (principalement sous forme de LDL), une activation de l'endothélium conduisant au dépôt de matrice extracellulaire, des infiltrats de cellules immunitaires et l'accumulation de lipides. Lors de son développement, il y a rétrécissement de la lumière artérielle. La plaque d'athérome peut devenir instable et se rompre pouvant entrainer une embolie artérielle ou veineuse déclenchant un évènement cardiovasculaire telle qu'une attaque ou un infarctus du myocarde. L'excès de LDL est sujet à une dégradation et agrégation au sein de la paroi vasculaire (122). L'activation des cellules endothéliales se traduit par une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence, telles que ICAM-1 (*intercellular adhesion molecules*), les sélectines P et E, augmentant l'adhérence et la transmigration de monocytes qui se différencieront en macrophages (122,581). L'activation de ces derniers entrainera la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8 et MCP-1), entrainant le recrutement d'autres cellules immunitaires (dont des lymphocytes T et B) (582,583). L'environnement inflammatoire peut entrainer la mort des cellules musculaires lisses (SMC), pouvant contribuer à la formation du cœur nécrotique de la plaque recouvert d'une couche fibreuse où la matrice extracellulaire rigidifie la structure (584). La prolifération et la migration des SMC ont également été décrites comme pouvant contribuer au développement de la plaque, assumant un rôle de production de matrice extracellulaire, collagène, cytokines et protéases (585,586), et pouvant faire office de support à la calcification des étapes ultérieures (587). Ce processus de remodelage impliquant la présence d'un tissu fibreux fin recouvrant un corps nécrotique épais, couplé avec le stress cellulaire lié à la circulation sanguine et l'érosion de l'endothélium peuvent causer l'instabilité de la plaque pouvant conduire à sa rupture et au processus de thrombose (588,589). Ce dernier stade implique l'activation des plaquettes circulantes entrainant la machinerie de coagulation (590).

Du fait de l'activation/apoptose des cellules endothéliales, des leucocytes, des SMC et des plaquettes, il est attendu que l'athérosclérose soit associée à une augmentation du nombre de MP issues de ces cellules. Cette augmentation a été observée par plusieures équipes au niveau sanguin (549–552), ainsi qu'au sein des plaques d'athéromes (554,555), (Figure 21).

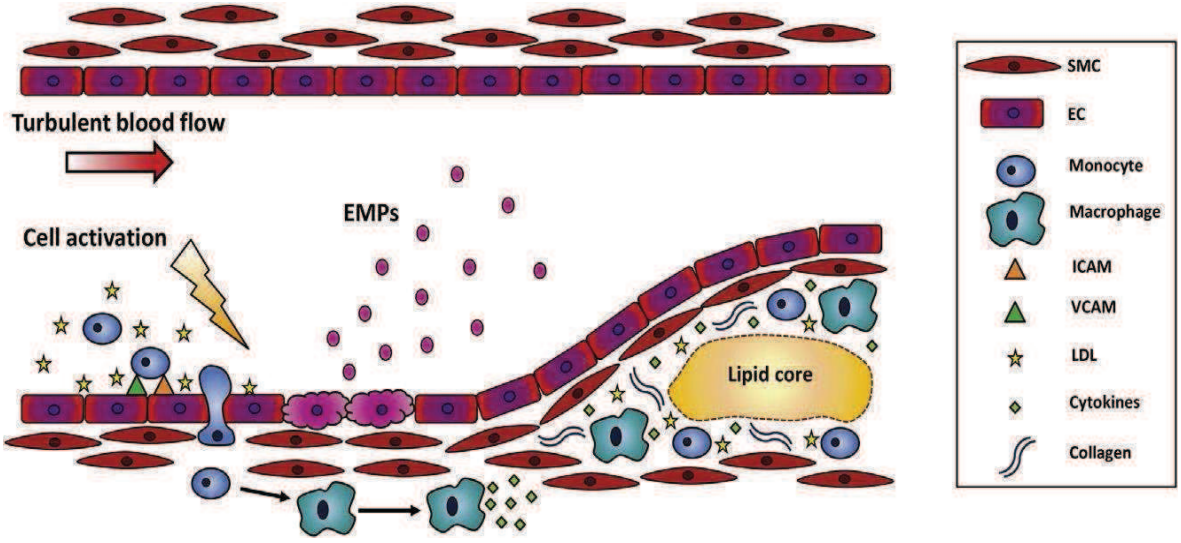


Figure 21 - Développement de la plaque d'athérome.
Les cellules endothéliales dans une zone de turbulence du flux sanguin deviennent perméables aux LDL, qui vont pouvoir s'oxyder une fois présents dans l'intima. En réponse à l'activation, l'expression des molécules d'adhérence (ICAM et VCAM) à la surface des cellules endothéliales est augmentée, favorisant le recrutement et l'infiltration de la paroi vasculaire par des cellules immunitaires (dont les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et les DC [pour rappel : un chapitre décrit le rôle des PDC dans l'athérosclérose et la plaque d'athérome, voir Figure 17). Les monocytes se différencieront en macrophages, puis en cellules spumeuses avec l'accumulation des lipides. L'environnement inflammatoire entrainera l'activation et l'apoptose des cellules endothéliales, à l'origine de la sécrétion de microparticules endothéliales (EMP). Les macrophages participent à l'inflammation par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ces processus, en combinaison avec la migration des cellules des muscles lisses et de la production de collagènes et de tissu fibreux, entrainent le développement de la plaque d'athérome. Adapté de la référence. (591). Abréviations : EC (*endothelial cells) :* Cellules endothéliales ; EMP (*Endothelial cells derived MP)* : MP Endothéliales ; ICAM-1, *Intracellular adhesion molecule 1* ; VCAM, *Vascular cell adhesion molecule*.

Comme cité ci-dessus, les MP peuvent être constituées de nombreux composés actifs (protéines, lipides, acides nucléiques) leur permettant de moduler la réponse cellulaire.

Le TNF-α (cytokine inflammatoire impliquée dans l'athérosclérose (592)) induit l'expression des molécules d'adhérence, sélectine E, VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales. Le TNF-α est par ailleurs un puissant inducteur de la vésiculation, et donc de la production d'EMP. L'utilisation d'un anticorps bloquant cette cytokine permettait de prévenir ces effets (593). Plusieurs équipes ont démontré que le taux d'EMP étant significativement plus élevé chez des patients souffrant de maladie de l'artère coronaire symptomatique (594–596). De plus, le contenu en miARN des EMP a été démontré comme significativement modifié chez ces patients (597). L'activation de monocytes et de macrophages entrainait la sécrétion de MP contenant les miARN miR-150 et miR-223, stimulant respectivement la prolifération des cellules endothéliales et la réponse inflammatoire (598,599). Alors que l'augmentation des EMP plasmatiques semble transitoire lors du développement de la

maladie, il a été observé une augmentation des LMP sanguines chez les patients présentant une plaque instable (600), faisant des LMP un marqueur de progression de la maladie. Les taux de MP ont également été démontrés comme pouvant être diminués lors de différents traitements cardio-protecteurs, faisant de ces MP un biomarqueur potentiel de l'efficacité thérapeutique. Cependant l'effet direct du traitement sur la production de MP ou sur le niveau de cholestérol reste à élucider (Tableau 9).

Tableau 9 - Effet des traitements des maladies cardiovasculaires sur le taux de microparticules plasmatiques.

Drug used	Effect on microparticles			
	EMP	PMP	LMP	MMP
Statins	↓	↓	↓	↓
	–	–	–	↓
	–	↓	–	–
Ang II receptor blockers	–	–	–	↓
	–	↓	–	–
Calcium channel blocker	–	↓	–	–
Aspirin	↓	↓	–	–
Clopidrogrel	–	↓	–	–
Digoxin	↑	↑	–	–

Abréviations : EMP (*Endothelial cells derived MP*) : MP endothéliales; PMP *(Platelets derived MP)* : MP plaquettaires ; LMP *(Leucocyte derived MP)* : microparticules leucocytaires ; MMP *(Monocytes derived MP) :* microparticules monocytaires. Adapté de la référence (591)

Il a été observé que les EMP pourraient diminuer la vasorelaxation de l'endothélium en inhibant l'effet de l'oxyde nitrique, *via* la formation de radicaux libres (601).

Les PMP ont également été observées comme augmentées dans l'athérosclérose. Elles reflètent l'activation plaquettaire (548,602). Les PMP peuvent se fixer sur les cellules endothéliales, permettant le recrutement de plaquettes activées sur le site inflammatoire (603). Des PMP générées selon différents stimuli entrainent l'expression d'ICAM-1 et la sécrétion de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1β, l'IL-6, et l'IL-8, favorisant le recrutement de monocytes et des polynucléaires neutrophiles (524). Les PMP ont aussi un effet pro-athérogénique par l'induction d'hyperplasie des SMC vasculaires (604).

L'analyse des MP présentes dans les plaques d'athérome a révélé une proportion majoritaire de MP leucocytaires, suivie des MP érythrocytaires (EryMP), issues des SMC et enfin endothéliales. Aucune différence de composition de ces MP n'a été observée entre les patients asymptomatiques et symptomatiques. Ces MP possédaient une activité pro-coagulante avec l'expression du TF, et la capacité de générer de la thrombine *in vitro* (554). Ces observations suggèrent une activité pro-

thrombotique de ces MP lors de la rupture de la plaque d'athérome. De plus, les EryMP peuvent servir de substrat à la phospholipase A2 sécrétée (sPLA2), produisant de l'acide lysophosphatidique (LPA) (605), un lipide à activité thrombotique et pro-inflammatoire préalablement démontré comme s'accumulant au sein des plaques d'athérome (606). D'autres activités ont été imputées aux MP présentes dans les plaques d'athérome telles qu'une activité métalloprotéinase impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire (facilitant la transmigration de leucocytes,(607)) ou la sécrétion de TNF-α (par TACE/ADAM17) (608). Ces MP présentes dans les plaques favoriseraient la formation de néo-vaisseaux, l'augmentation de molécules d'adhérence et donc le recrutement de leucocytes circulants (609). Des MP générées en culture à partir de monocytes ou d'explants aortiques murins en présence de cholestérol augmentent l'adhérence et le recrutement des leucocytes sur les cellules endothéliales, par activation de NF-κB et induction d'ICAM-1 dans ces dernières (610). Il est cependant important de noter que des LMP auraient aussi des activités anti-athérogéniques. Des MP circulantes contenant des épitopes spécifiques de l'oxydation (ex : phospholipides oxydés) peuvent avoir un effet athéro-protecteur par la fixation d'immunoglobulines naturelles (IgM), prévenant l'activation inflammatoire des monocytes (611). Des MP issues de lymphocytes T apoptotiques exerceraient un effet antioxydant par la diminution de la production de ROS et en prévenant l'apoptose des cellules endothéliales (612).

Les MP de différentes origines cellulaires ont été associées à l'athérosclérose. Les mécanismes impliquant ces dernières sont multiples. Une meilleure connaissance de ces mécanismes permettrait de prévenir des évènements cliniques, ainsi que d'apprécier l'efficacité d'une réponse thérapeutique.

2. Autres maladies inflammatoires : Les maladies auto-immunes

Etant donné le potentiel pro-ou anti-inflammatoire des MP, plusieurs études se sont intéressées à l'implication des MP circulantes ou présentes dans les sites inflammatoires dans différentes pathologies inflammatoires, notamment les maladies auto-immunes. Les principales MP circulantes chez le sujet sain sont les MP d'origine plaquettaire, suivies de celles dérivées des globules rouges (613). Une augmentation de MP de différentes origines a été retrouvée dans des pathologies auto-immunes systémiques, telles que la sclérodermie, la polyarthrite rhumatoïde (PR), le syndrome de Sjögren, le lupus érythémateux systémique (LES), le psoriasis ou encore les vascularites (541,559–561,563,565,566,568,570–572,579,613). Les MP plaquettaires sont retrouvées élevées dans toutes les pathologies citées. Mais, il peut aussi s'agir des MP endothéliales dans le psoriasis, les vascularites et la sclérodermie ; des MP dérivées des leucocytes dans le syndrome de Sjögren, la PR et le psoriasis. Certaines études apportent plus de précision quant à l'origine leucocytaire avec des MP issues des

polynucléaires neutrophiles dans les vascularites, les monocytes dans la PR et la sclérodermie ou les lymphocytes T dans cette dernière pathologie (554–556, 560, 563,565–567, 574,608–611).

Comment intégrer cette augmentation des MP dans ces pathologies auto-immunes ? Nous n'évoquerons pas dans les détails leur rôle dans l'effet pro-coagulant, mais nous nous intéresserons principalement à leur rôle immunologique.

Les MP, de tailles variables retrouvées dans le liquide synovial de patients atteints de PR, peuvent représenter une source d'auto-antigènes et fixer les auto-anticorps formant des complexes immuns pouvant être impliqués dans la physiopathologie de cette maladie. Ceci a notamment été observé avec les MP de grande taille (700-3000 nm) (541). Il a également été observé des MP faisant office d'auto-antigènes dans le LES et ayant la capacité de fixer les auto-anticorps pour former des complexes immun (614–617). Enfin, dans un modèle murin de diabète de type I, les MP générées par apoptose de cellules d'insulinome (pour mimer les MP issues des cellules β sécrétrice d'insuline) induisent une réponse T autoréactive (618). Les MP sont donc impliquées dans le transport des auto-antigènes et éventuellement le déclenchement des réponses auto-immunes.

Les MP peuvent également être impliquées dans la physiopathologie de ces maladies par leur capacité à augmenter la réponse inflammatoire et perturber la résolution de l'inflammation. La dégradation du tissu cartilagineux dans la PR est considérée comme le résultat de la sécrétion d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire par les fibroblastes. Or, cette sécrétion a été démontrée comme pouvant être stimulée par des MP dérivées de leucocytes (619). Les MP présentes dans le liquide synovial stimulent la sécrétion de cytokines et chimiokines (dont IL-6, MCP-1, IL-8 et RANTES) par les synoviocytes, augmentant le recrutement des leucocytes dans la zone inflammatoire (570). Un taux élevé de PMP plasmatiques et dans le liquide synovial a également été observé chez les patients atteints de PR. Ces dernières montrent une activité pro-coagulante et pro-inflammatoire (563,569,620,621). Les MP peuvent exercer différentes actions pro-inflammatoires par les composants bioactifs qu'elles véhiculent (Tableau 7).

IV. Conditions d'utilisation des microparticules pour leur caractérisation fonctionnelle

Comme nous l'avons vu, les MP peuvent être générées durant l'activation ou l'entrée en apoptose des cellules. De plus, leur profil se distingue par les marqueurs de surface ainsi que leur contenu en fonction du signal d'induction. Ce profil peut donc être spécifique du contexte pathologique considéré, et la caractérisation des MP circulantes peut servir de biomarqueur, accessible de manière non invasive (par prélèvement sanguin) du développement et de la réponse thérapeutique d'une pathologie donnée (622). Ceci ne fait pas l'objet de ce manuscrit. Cependant, il est important d'avoir à l'esprit que la caractérisation du profil des MP peut être très variable en fonction : de la technique de préparation des échantillons, d'isolement/purification, et d'analyse (sensibilité et accessibilité des techniques) (474). Nous nous limiterons ici à illustrer les principales techniques de préparation et d'analyse fonctionnelle

1. Préparation spécifique des échantillons

Bien que l'ultracentrifugation soit suffisante à la préparation des échantillons pour une caractérisation morphologique ou phénotypique (expression de protéines membranaires), le chevauchement des caractéristiques physiques des vésicules extracellulaires (EV) rend leur utilisation en étape simple peu performante (Figure 22).

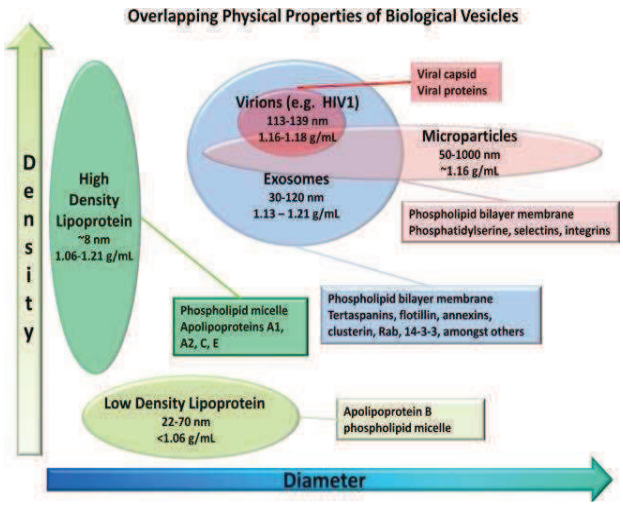


Figure 22 - Chevauchement des propriétés physiques des vésicules biologiques.
Adaptée de la référence (623).

Cependant, plusieurs méthodes pouvant être utilisées de manière séquentielle permettent un bonne purification : La séparation sur gradient de densité (624), par immuno-fixation (625), ou encore par chromatographie d'exclusion de taille (406). Bien que des échantillons de MP aient montré des contaminations par des complexes immuns (626), les risques de contamination sont plus importants

pour les échantillons dont la préparation comporte une ultracentrifugation à grande vitesse (>100000 *g*, nécessaire aux exosomes) ou pas d'étape d'ultracentrifugation (406) pouvant entrainer la précipitation d'agrégats protéiques (627) ou de lipoprotéines.

2. Analyses fonctionnelles

Certaines fonctionnalités biologiques des microparticules peuvent être directement appréciées. C'est le cas pour l'activité pro-coagulante basée sur l'exposition de PS ou TF, ou la génération de thrombine. Ls techniques permettant d'accéder à ces informations consistent à l'immobilisation des microparticules dans une plaque 96 puits d'ELISA au fond de laquelle de l'AnxV (pour le test PS) ou un anticorps anti-TF est fixé. L'activité des MP issues du plasma sera alors évaluée après lavage, par ajout de facteurs FXa, FVa et FII en présence de Ca^{2+} (test PS), ou FVIIa et FX pour le test de l'activité TF. L'activité spécifique du TF est contrôlée par un anticorps anti-TF.

D'autres techniques moins standardisées permettent d'accéder à l'activité inflammatoire des MP par ajout direct sur des cellules en culture. Différents paramètres inflammatoires des cellules pourront alors être mesurés (expression de marqueurs spécifiques, prolifération, production et sécrétion de cytokines…) (327,628,629).

De manière arbitraire et en référence à la littérature, nous avons utilisé le terme MP (suspension enrichie en MP). Mais, nous sommes conscient de l'hétérogénéité de la suspension (vésicules extracellulaires avec principalement des MP).

TRAVAUX PERSONNELS

Chapitre I. Objectifs du travail de thèse

Pourquoi s'intéresser aux *Liver X receptors* (LXR) dans les PDC et leur contrepartie leucémique les LPDC ?

Les LXR sont des récepteurs nucléaires exprimés sous deux isoformes dans l'organisme. L'isoforme LXRα présente une expression restreinte aux cellules impliquées dans le métabolisme lipidique et du cholestérol (dont les hépatocytes, adipocytes et les macrophages). En revanche, l'isoforme LXRβ a une expression ubiquitaire (104). L'expression et la fonctionnalité des récepteurs LXR dans les PDC n'ont pour l'heure pas été décrites. Cependant, certaines pistes laissent penser que ces récepteurs LXR pourraient moduler les fonctions des PDC et des LPDC. Dans les cDC, il a été décrit que l'activation des LXR inhibait la production de cytokines inflammatoires *via* l'inhibition de NF-κB (80). Cet effet est retrouvé aussi avec les macrophages (152,171). Dans ces cellules phagocytaires professionnelles, il a été décrit que les corps apoptotiques induisaient l'activation des récepteurs LXR. Ceci avait pour effet d'augmenter l'expression du récepteur aux phosphatidylsérines (PS) Mertk augmentant ainsi la prise en charge des corps apoptotiques par les macrophages, et finalement inhibant la réponse inflammatoire *via* ces récepteurs LXR (152). Une autre étude a démontré que l'activation de Mertk augmentait l'expression des LXR dans des macrophages, permettant l'inhibition de la réponse inflammatoire (630). L'effet anti-inflammatoire de la stimulation de Mertk par des corps apoptotiques avait également été démontrée dans des cDC comme inhibant la voie NF-κB (333). Les PDC peuvent internaliser des MP qui, comme les corps apoptotiques, exposent les PS les MP (327,407). Notre premier objectif a été de déterminer si les récepteurs LXR pouvaient être impliqués dans la prise en charge des MP et pouvaient induire un effet anti-inflammatoire. Pour cela, nous avons comparé deux types de MP, issues de cellules d'origine différente et aux propriétés inflammatoires distinctes : les MP d'origine plaquettaire isolées à partir de volontaires sains et des MP produites *in vitro* à partir d'une lignée de cellules endothéliales, déjà caractérisées dans notre laboratoire comme activant la production de cytokines inflammatoires par les PDC (327). Dans ce travail, nous sommes restés focalisés sur la réponse innée des PDC avec la production de cytokines, la voie de signalisation NF-κB et l'étude de l'internalisation des MP.

Les récepteurs LXR ont été initialement décrits comme impliqués dans l'homéostasie du cholestérol. Leur activation conduit à une diminution de la capture du cholestérol exogène par la dégradation des

récepteurs LDLR et VLDLR (631,121), l'inhibition de la synthèse du cholestérol (133), et l'augmentation de l'efflux du cholestérol par les transporteurs ABCA1/ABCG1 (104). Les cellules malignes présentent une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol pouvant associer : une augmentation de la capture du cholestérol exogène par surexpression et/ou maintien de l'expression des récepteurs LDLR et VLDLR (175,176), une augmentation de la synthèse du cholestérol (175), ainsi qu'une diminution de l'efflux du cholestérol (632). Cette augmentation du cholestérol intracellulaire disponible pourrait permettre la formation de membrane plasmique nécessaire à la prolifération cellulaire. Dans ce cadre, l'activation des récepteurs LXR représente une approche thérapeutique intéressante (discutées dans la revue (186)). Notre second objectif a donc été de déterminer si la dérégulation du métabolisme du cholestérol (incluant des gènes cibles de LXR) pouvait être associée à l'agressivité de cette leucémie se traduisant par une signature transcriptomique distincte d'autres leucémies. Nous nous sommes intéressés à l'activation basale des LXR dans les LPDC, ainsi qu'aux effets induits par un traitement par des agonistes LXR dans ces cellules. En vue d'une application thérapeutique, nous avons restreint notre étude à l'effet antiprolifératif et cytotoxique de ces composés *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin de xénogreffe. Nous avons étendu notre étude à l'interaction des LXR et les voies de signalisation contribuant à l'agressivité des LPDC/BPDCN.

Chapitre II. Resultats

Etude 1 : Implication des LXR dans l'internalisation de microparticules par les PDC, et dans la réponse inflammatoire induite.

Dans les cellules phagocytaires, il a été observé que les LXR étaient impliqués dans l'internalisation de dérivés cellulaires (les corps apoptotiques) et la régulation de la réponse inflammatoire (152). Les PDC sont décrites comme ayant une capacité plus restreinte d'endocytose/phagocytose que les Mρ et cDC. Cependant, des études ont montrées qu'elles pouvaient prendre en charge des dérivés cellulaires produits lors de l'apoptose et de l'activation des cellules : les microparticules (MP) (327,407). De manières intéressante, les PDC et les MP (principalement dérivées de cellules endothéliales ou EMP) ont été conjointement observées dans des pathologies inflammatoires et auto-immunes, dont l'athérosclérose, le LES et le psoriasis. Une étude précédente de notre équipe avait mise en évidence que des EMP contrairement aux MP dérivées de plaquettes (PMP) induisaient la sécrétion de cytokines inflammatoires par les PDC (327). Les mécanismes impliqués dans ces effets n'ont cependant pas encore été élucidés. Les mécanismes décrits comme intervenant dans la régulation de la réponse inflammatoire par les corps apoptotiques impliquent les récepteurs aux PS (dont Mertk), les récepteurs nucléaires LXR et la régulation de facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation (dont NF-κB) (152). Comme les corps apoptotiques, les MP, appelées aussi ectosomes, sont des vésicules constituées de « bouts » de membrane plasmique cellulaire, pouvant être produites lors de l'apoptose et exposant des PS à leur surface, ainsi que des molécules dérivées de leur cellules d'origine. Cependant, l'expression et la fonction des LXR dans les PDC n'ont pas encore été décrites.

Nous nous sommes donc intéressés à l'implication des LXR dans la prise en charge des MP par les PDC et la réponse inflammatoire qui en découle. Pour cela, nous avons dans un premier temps évalué l'expression et la fonction (activité transcriptionnelle) des LXR dans les PDC. Nous avons utilisé des PDC triées à partir de donneurs de sang et une lignée de PDC leucémiques, la lignée CAL-1. Nous avons montré que les PDC expriment principalement l'isoforme LXRβ et répondent à l'activation de trois agonistes LXR (le 22-R-hydroxycholestérol [22RHC], le T0901317, et le GW3965) par la surexpression des ARNm de gènes cibles de LXR (*srebpc1* et *abca1*). Nous avons montré avec l'aide de la lignée CAL-1 (pour laquelle nous n'avions pas de limite quant au matériel disponible pour réaliser un Western blot) que les PDC exprimaient principalement l'isoforme LXRβ et que la protéine ABCA1 était augmentée par le traitement avec les agonistes LXR. Nous avons confirmé par

microscopie confocale (moins exigeante en termes de nombre de cellules, donc applicable aux PDC) cette augmentation de la protéine ABCA1 à la membrane des PDC issues de sujets sains, et stimulées par les agonistes LXR. Nous avons montré que la voie LXR interfère plutôt avec la voie TLR7 en diminuant la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6 et TNF) et la translocation de la sous-unité de NF-κB, p65 (RelA).

Après avoir vérifié la capacité de répression de la production de cytokines inflammatoires *via* l'interférence avec la voie NF-κB des agonistes LXR, nous avons montré que la stimulation de la voie LXR augmentait l'internalisation des MP par les PDC *via* le récepteur aux PS, BAI1.

L'effet des EMP et PMP sur la réponse innée des PDC et la stimulation de la voie LXR a ensuite été étudié. Après avoir démontré que les PMP diminuaient la synthèse de TNF et d'IL-8 par les PDC et que cette diminution était d'autant plus importante que le nombre de PMP augmenté, nous avons observé que les PMP stimulaient la transcription des gènes cibles de LXR (*lxra*, *srebp1c*, *abca1*), ainsi que *bai1*. L'inhibition préalable de la voie LXR par l'antagoniste 22-S-Hydroxycholestérol (22SHC) prévenait ces effets et restaurait une augmentation de la transcription du gène du TNF par l'exposition aux PMP. Les PMP exercent donc des propriétés anti-inflammatoires sur les PDC en activant la voie LXR.

Nous avons ensuite exploré la capacité des EMP connues exerçant des fonctions pro-inflammatoires à stimuler aussi la voie LXR. Contrairement aux PMP, l'incubation des PDC avec les EMP diminuait la transcription des gènes cibles de LXR. L'incubation préalable avec un agoniste de LXR GW3965 permettait la stimulation de la transcription des gènes cibles de LXR. Nous avons montré que les EMP activaient la voie NF-κB dans les PDC. En utilisant les PDC et la lignée CAL-1, ainsi que l'agoniste LXR GW3965, l'agoniste de TLR7 R848 et l'inhibiteur de NF-κB JSH-23, nous avons pu montrer qu'il existait une opposition entre la voie LXR et celle de NF-κB avec une dominance de la voie NF-κB qui inhibait la voie LXR. Ce mécanisme d'inhibition de la voie LXR par l'activation de celle de NF-κB s'applique aux EMP.

En conclusion, la voie de signalisation engagée par les MP (LXR ou NF-κB) conditionne la réponse des PDC (anti-inflammatoire avec les PMP ou pro-inflammatoire avec les EMP).

1. **Article**

Letter to the Editor

The Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Derived Microparticles in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Involve Liver X Receptor Activation

by Adam Ceroi, Fanny Angelot Delettre, Charline Marotel, Thierry Gauthier, Afag Asgarova, Sabéha Biichlé, Anne Duperrier, Guillaume Mourey, Sylvain Perruche, Laurent Lagrost,David Masson, and Philippe Saas

Haematologica 2015 [Epub ahead of print]

Citation: Ceroi A, Angelot-Delettre F, Marotel C, Gauthier T, Asgarova A, Biichlé S, Duperrier A, Mourey G, Perruche S, Lagrost L, Masson D, and Saas P. The Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Derived Microparticles in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Involve Liver X Receptor Activation. Haematologica. 2015; 100:xxx
doi:10.3324/haematol.2015.135459

Publisher's Disclaimer.
E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production proces.

Letter to the Editor

The Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Derived Microparticles in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Involve Liver X Receptor Activation

Adam Ceroi,[1-4] Fanny Angelot Delettre,[1-4] Charline Marotel,[1-3] Thierry Gauthier,[1-4] Afag Asgarova,[1-3] Sabéha Biichlé,[1-4] Anne Duperrier,[1-3] Guillaume Mourey,[1-3] Sylvain Perruche,[1-4] Laurent Lagrost,[4-7] David Masson,[4-7] and Philippe Saas[1-4,8]

[1]INSERM, UMR1098, F-25000 Besançon, France

[2]EFS Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, F-25000 Besançon, France

[3]Univ. Bourgogne Franche-Comté, UMR1098, F-25000 Besançon, France

[4]LabEX LipSTIC, ANR-11-LABX-0021, Besançon/Dijon, France

[5]INSERM, U866, F-21000 Dijon, France

[6]Univ. Bourgogne Franche-Comté, UMR866, F-21000 Dijon, France

[7]CHRU Dijon, F-21000 Dijon, France

[8]CHRU Besançon, INSERM CIC1431, FHU INCREASE, F-25000 Besançon, France

Correspondence: philippe.saas@efs.sante.fr

Main text word count: 1471

Figures: 3

1 associated supplemental file

Key Words: LXR – plasmacytoid dendritic cells – Ectosomes – Extracellular vesicles – Microvesicles

– inflammation

Innate immune responses play a critical role in atherosclerosis progression. Beside the well-known implication of macrophages,1 plasmacytoid dendritic cells (PDC) emerge as cells present in atherosclerotic lesions that may participate to or regulate atherosclerosis.2 These cells can exert both pro- and anti-inflammatory functions.3 This is the case of other cellular messengers, namely microparticles (MP),4 also implicated in atherosclerosis.4 Depending on their cellular origin, MP could either activate or inhibit PDC inflammatory responses.5 However, signaling pathways involved in these PDC responses remain to be identified. As membrane-derived by-products, MP after internalization can be a source of intracellular cholesterol derivatives,6 that trigger liver X receptors (LXR).7 LXR are nuclear receptors regulating innate immune responses,8 including cell-derived by- product internalization, such as apoptotic bodies9 that belong together with MP to extracellular vesicles. Here, implication of the LXR pathway in MP engulfment by PDC and the subsequent PDC inflammatory responses were investigated.

Human PDC were isolated by magnetic cell separation (Diamond PDC isolation Kit II, Miltenyi Biotec) from blood of healthy donors after the signature of informed consent and were stimulated with 3 different LXR agonists (22-R-Hydroxycholesterol [22RHC], T0901317 and GW3965), LXR antagonist 22-S-Hydroxycholesterol (22SHC, Sigma Aldrich), MP or toll-like receptor (TLR)7 ligand, R848 (1 µg/ml), or TLR9 ligand, CpG-ODN2216 (class A CpG-containing oligodeoxynucleotides [ODN], 2 µmol/L)(Invivogen). Endothelial-derived MP (EMP) were isolated from a TNF-α-stimulated endothelial cell line and platelet-derived MP (PMP) from platelet concentrate supernatants of healthy donors as described in Supplemental Methods. Microparticle size (using Megamix plus™ microbeads, BioCytex), count (using Cytocount® microbeads, Dako) and phenotype (CD31, CD41, CD235a expression or Annexin V [AnxV] staining), were determined by cytometry (Navios cytometer with the CXP software, Beckman Coulter). PDC expression of CD123, BDCA-2/CD303, BAI-1 (brain-specific angiogenesis inhibitor-1) and intracellular TNF-α as well as detection of eFluor^{+} PDC after incubation with eFluor-labeled MP were determined by cytometry (FACS Canto II cytometer with the DIVA 6.1 software, BD Biosciences). Unconjugated monoclonal antibodies and their control isotypes were used to block BAI-1 or detect CD123, ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) and phosphorylated NF-κB subunit RelA (pRelA) after staining with a fluorochrome-conjugated anti-Ig secondary antibody (Life Technologies). Fluorescent images were acquired on an Olympus FV1000 confocal microscope and analyzed with Olympus FV-viewer software. Culture supernatants were collected after PDC treatment to measure the following cytokines: TNF-α, IL-6 and IL-8 (DIAplex technology, Diaclone), or interferon (IFN)-α (Platinum ELISA kit, eBioscience). Expression of LXR target gene, cytokine or endocytic receptor mRNA was assessed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) using either the Power SYBR Green PCR

Master Mix or Taqman Universal Buffer II (Applied Biosystems) on a CFX96 Real-Time System (Biorad). An expanded methods section is available in Online Supplementary Appendix.

Freshly isolated PDC were treated with either LXR agonists (T0901317, GW3965, 22RHC) or LXR antagonist (22SHC) for 24 hours, and expression of LXR target genes (*srebp1c* and *abca1*) was assessed by qRT-PCR. 22SHC inhibited *srebp1c* mRNA expression, while LXR agonists increased both *srepb1c* and *abca1* mRNA (Figure 1A), suggesting LXR pathway activation in PDC. LXR (*lxra* and *lxrb*) isoform mRNA expression was assessed by qRT-PCR in freshly isolated PDC. Preferential expression of the ubiquitous *lxrb* isoform mRNA by PDC was shown (Supplemental Figure 1). Increase expression of ABCA1 at protein level after LXR agonist treatment was confirmed by induction of ABCA1 expression on PDC membrane, as assessed by confocal microscopy (Figure 1B). In other immune cells, LXR activation has been described to alter TLR stimulation,[8,10] and promote phosphatidylserine (PtdSer) positive apoptotic body internalization.[9] We evaluated whether LXR stimulation modulates PDC responses to TLR signaling. PDC were first treated with LXR agonists for 24 hours, and stimulated with TLR ligands, R848 (TLR7) and CpG-ODN2216 (TLR9) for 18 hours. Secretion of TNF-α and IL-6 was significantly reduced when PDC were pretreated with LXR agonists (Figure 1C). PDC CAL-1 cells expressed reduced intracellular TNF-α levels when pretreated with LXR agonists before TLR7 stimulation (Figure 1C). However, LXR agonist pretreatment did not affect TLR9-induced cytokine production by PDC (Figure 1C). In contrast to TLR9, TLR7 stimulation involves predominantly the canonical NF-κB signaling pathway in PDC.[11] Pretreatment of PDC for 24 hours with LXR agonists, T0901317 or GW3965 followed by R848 stimulation for 45 minutes decreased significantly pRelA staining analyzed by confocal microscopy (Figure 1D). This demonstrates that the LXR pathway is fully functional in human PDC and its activation inhibits TLR7- mediated NF-κB activation and pro-inflammatory cytokine secretion. This was shown using three different LXR agonists, including GW3965 considered as a pure LXRα/β agonist.[12] As described in macrophages or conventional DC,[8,10] LXR triggering in PDC blocks TLR signaling pathway. NF-κB inhibition by LXR triggering involves stabilization of a corepressor/NF-κB complex in target gene promoter,[8] or prevention of NF-κB p50 subunit nuclear translocation.[10] Here, we observed an inhibition of RelA phosphorylation.

Despite PDC are not professional phagocytes participating to apoptotic cell/body removal like macrophages (discussed in Ref.[13]), PDC are able to internalize membrane-derived MP.[5] We then evaluated the role of LXR in PtdSer-dependent MP internalization by PDC. After showing that MP uptake by PDC was PtdSer-dependent using AnxV, we observed that LXR stimulation significantly increased eFluor-labeled MP internalization by PDC (Figure 1E). T0901317 treatment

showed a concentration-dependent upregulation of *bai1* mRNA levels. The same effect was obtained with the two other LXR agonists, while 22SHC did not change *bai1* mRNA expression (Figure 1F). Increased BAI-1 membrane expression on PDC was confirmed after T0901317 or GW3965 treatment by cytometry (Figure 1G). Finally, blockade of BAI-1 using an anti-BAI-1 antibody significantly reduced MP uptake by LXR-stimulated PDC (Figure 1H). While LXR activation in macrophages induces Mer-tk expression,[9] neither *stabilin2, tim1, tim4* nor *mertk* PtdSer receptor mRNA expression were modulated in PDC after LXR activation (*data not shown).* Moreover, Mer-tk blockade in PDC has no effect (*data not shown*). Overall, LXR activation in PDC significantly enhances MP uptake through upregulation of the Ptdser receptor BAI-1. This was observed whatever the MP origin, EMP or PMP (Supplemental Figure 2).

Since MP contain potential cholesterol-derived LXR ligands,[6] we evaluated LXR activation in PDC after MP co-culture. PMP or EMP were previously reported to exert anti- or pro-inflammatory effects, respectively.[5] We confirmed here that PMP decreased TNF-α and IL-8 secretion in a PMP number- dependent manner (Figure 2A-B). Looking at the LXR pathway, we observed a significant induction of LXR target gene (*lxra*, *srebp-1c* and *abca1*) and *bai1* transcription, while *tnfa* mRNA levels were significantly diminished in PDC depending again on the number of PMP (Figure 2C). PDC pretreatment with the LXR antagonist 22SHC before PMP addition tend to prevent LXR target gene expression upregulation while increased significantly *tnfa* mRNA expression (Figure 2D). This identifies a novel anti-inflammatory mechanism of PMP: the activation of LXR pathway.

EMP are endowed with pro-inflammatory properties.[5] After having confirmed that TNF-α and IL-8 secretion were increased after EMP incubation, we observed that EMP induced NF-κB activation in PDC associated with an increase of *tnfa* mRNA levels (Figure 3A). A downregulation of LXR target gene (*srebp1c* and *abca1*) transcription in PDC in an EMP number-dependent manner was also observed (Figure 3B). This effect of EMP was prevented by the prior LXR activation and associated with a significant decreased *tnfa* mRNA expression (Figure 3C). These data suggest an inhibition of LXR pathway by NF-κB. To confirm this hypothesis, PDC CAL-1 cells were treated simultaneously with the LXR agonist GW3965 and TLR7 ligand R848 in the presence of the NF-κB inhibitor, JSH-23 or not. R848 treatment downregulated LXR target gene expression induced by GW3965, while JSH- 23 addition reversed totally this effect (Figure 3D). Thus, TLR signaling pathway dominates LXR pathway and NF-κB blockade is sufficient to restore LXR pathway activation. To translate this observation into EMP, freshly isolated PDC co-cultured with EMP were simultaneously treated with JSH-23. While JSH-23 restored slightly the increase of *lxra* mRNA expression, we observed a reduction of *il6* and *tnfa* mRNA levels, statistically significant for *tnfa* mRNA (Figure 3E). Restoration of LXR pathway activation in

response to EMP by NF-κB blockade was confirmed by increased ABCA1 membrane expression, assessed by confocal microscopy (Figure 3F). Finally, PDC treatment with R848 simultaneously to PMP decreased significantly *lxra* mRNA expression induced by PMP and increased *il6* mRNA expression (*Supplemental Figure 3*). These results confirm the critical role of NF- κB and LXR signaling pathway activation during MP engulfment by PDC, determining the pro-*versus* anti-inflammatory response of these cells.

Overall, this study demonstrates a functional LXR pathway in PDC and a unique LXR/NF-κB balance that controls the non-inflammatory *versus* inflammatory status of MP engulfed by PDC. This remains to be confirmed in pathological settings. However, since increased circulating EMP levels and pro- inflammatory PDC may be implicated in atherosclerosis, we may hypothesize that NF-κB signaling dominates LXR pathway in this setting. Whether LXR activation could be a potential therapeutic target in atherosclerosis and other pathologies involving PDC and EMP dysregulation[3] (including lupus or psoriasis[9,14,15]) remains to be investigated.

Acknowledgments: The authors would like to thank Dr Maeda (Nagasaki University, Japan) for kindly providing us with the human PDC line CAL-1, Sarah Odrion for editorial assistance, Yassin Tachikart and Aurore Gaillardet for technical assistance, Prof M de Carvalho Bittencourt (Université de Lorraine, France) for stimulating discussions.

Funding:This study was supported by the Etablissement Français du Sang (EFS, grant #2011–11 to PS), the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021), the Conseil Régional de Franche-Comté (“soutien au LabEX LipSTIC” 2014 & 2015 to PS), and the Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne Franche-Comté (BQR BFC to DM & PS).

Disclosures/Conflict of Interest
None

Author Contributions

All authors listed on the manuscript have substantially contributed to this work. AC participated in experimental design, performed research, analyzed data and wrote the manuscript; PS designed experimental research, interpreted data and wrote the manuscript; FAD, CM, TG, AA, SB, AD, MG participated in experimental work; SP, LL and DM participated in experimental design, interpretation of data, and helped writing the manuscript.

References

1. Zeller I, Srivastava S. Macrophage functions in atherosclerosis. Circ. Res. 2014;115(12):e83–85.
2. Döring Y, Zernecke A. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis. Front Physiol. 2012;3:230.
3. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annu Rev Immunol. 2011;29:163–183.
4. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, et al. Endothelial microparticles in diseases. Cell Tissue

Res. 2009;335(1):143–151.

5. Angelot F, Seilles E, Biichle S, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. Haematologica. 2009;94(11):1502–1512.

6. Biró É, Akkerman JWN, Hoek FJ, et al. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. J Thromb Haemost. 2005;3(12):2754–2763.
7. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(1):266-271
8. Kiss M, Czimmerer Z, Nagy L. The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology. J Allergy Clin Immunol. 2013;132(2):264–286.
9. A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, et al. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of LXR. Immunity. 2009;31(2):245–258.
10. Canavan M, McCarthy C, Larbi NB, et al. Activation of liver X receptor suppresses the production of the IL-12 family of cytokines by blocking nuclear translocation of NF-κBp50. Innate Immun. 2014;20(7):675-687.

11. Bao M, Liu Y-J. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. Protein Cell. 2013;4(1):40–52.

12. Ito A, Hong C, Rong X, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. Elife. 2015;4:e08009.
13. Saas P, Kaminski S, Perruche S. Prospects of apoptotic cell-based therapies for transplantation and inflammatory diseases. Immunotherapy. 2013;5(10):1055–1073.
14. Pelletier F, Garnache-Ottou F, Angelot F, et al. Increased levels of circulating endothelial-derived microparticles and small-size platelet-derived microparticles in psoriasis. J Invest Dermatol. 2011;131(7):1573–1576.
15. Parker B, Al-Husain A, Pemberton P, et al. Suppression of inflammation reduces endothelial microparticles in active systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2014;73(6):1144–1150.

Figure Legends

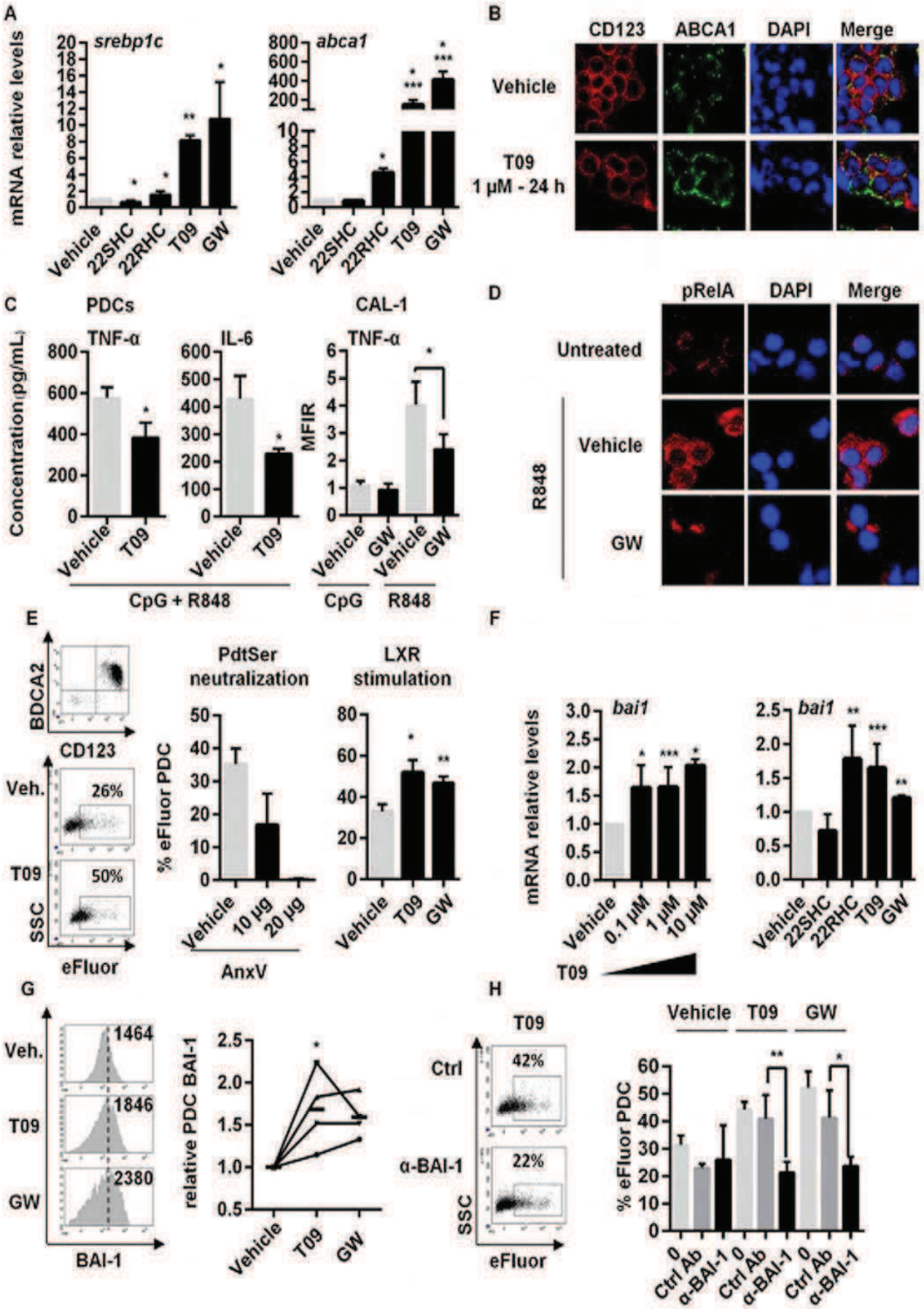


Figure 1: Stimulation of LXR pathway in PDC inhibits TLR7-induced NF-κB activation, pro-inflammatory cytokine secretion and upregulates MP internalization *via* BAI-1.

A. Different LXR agonists, T0901317 (T09), GW3965 (GW), 22RHC or LXR antagonist 22SHC were added (1 µM) to PDC from healthy donors for 24 hours and LXR target gene (*srebp1c, abca1, lxra [not depicted]*) expression was assessed by qRT-PCR (n=7, meaning PDC isolated from 7 different donors). **B.** Freshly isolated PDC were stimulated with 1 µM of T0901317 (T09) for 24 hours. Then, CD123 and ABCA1 cell surface expression was evaluated by confocal microscopy analysis. Results from a representative experiment out of 3 using PDC from 3 different donors. **C.** Freshly isolated PDC (left panels) or PDC cell line CAL-1 cells (right panel) were treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 hours, followed by a 18 hour stimulation using CpG-ODN2216 (CpG, 2 µM) + R848 (1 µg/mL)(left panels), representing TLR9 and TLR7 ligand, respectively or each ligand separately (right panel). Supernatants were then collected and assessed for TNF-α and IL-6 by multiplex assays (n=5). Intracellular TNF-α in CAL-1 cells were also assessed by cytometry. Cumulated mean fluorescent intensity ratio (MFIR = MFI of treated cells/MFI of untreated vehicle cells) are shown (right panel) as mean ± S.E.M. of the 5 independent experiments. **D.** Freshly isolated PDC were treated for 24 hours with 1 µM of GW3965 (GW), followed by TLR7 ligand, R848 (1µg/mL) for 45 min. Phosphorylation of the NF-κB p65 (pRelA) subunit and its cellular localization were evaluated by confocal microscopy analysis. Results from a representative experiment out of 3 using PDC from 3 different donors. **E.** PDC were treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW), washed and cultured with eFluor-labeled MP for 4 hours at a 1:40 PDC:MP ratio. MP uptake by PDCs was evaluated by measuring $eFluor^+$ PDC by cytometry (n=3). Left panel shows a representative experiment. Middle panel shows that MP uptake required PdtSer/PdtSer receptor interactions since blockade of these interactions using unlabeled Annexin-V (AnxV at 10 µg or 20 µg) incubated for 30 min with e-Fluor labeled MP decreases the percentage of $eFluor^+$ PDC (n=3). This shows that free eFluor released from MP was not responsible for PDC labelling. Right panel: Cumulative data of 3 independent experiments using LXR agonist-treated PDC from 3 different donors expressed as mean + S.E.M. are shown. **F.** PDC were treated with increasing concentrations of T09 (0.1 µM, 1 µM or 10 µM) for 24 hours (left panel) or LXR agonists, T0901317 (T09), GW3965 (GW), 22RHC or LXR antagonist 22SHC (1 µM) and *bai1* gene expression was quantified by qRT-PCR (n=5). **G.** PDC were treated 24 hours with 1 µM of T0901317 (T09) and GW3965 (GW) and BAI-1 expression was assessed by cytometry (1 representative experiment out of 4, left panel). Numbers represents mean fluorescent intensity (MFI). Data of 4 independent experiments using PDC from 4 different donors expressed as relative PDC BAI expression obtained using the following formula [% of PDC stained with anti-BAI-1 mAb after treatment]/[% of PDC stained with anti-BAI-1 mAb in vehicle condition], bold lines represent the

mean of the 4 experiments (Mean ± SEM,*p<0.05, Wilcoxon) (right panel). **H.** PDC were treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 hours. Then, cells were cultured for 1 hour with neutralizing anti-BAI-1 antibody (α-BAI-1) or irrelevant control antibody (Ctrl Ab), before adding eFluor-labeled MP for 4 h and analyzing by cytometry. (n=4). Dot plot from one experiment representative of 4 (left panel). Cumulative data of 4 independent experiments expressed as mean + S.E.M. of $eFluor^+$ PDC are shown. Unless specified, all data were expressed as mean ± S.E.M. from n independent experiments. * p<0.05, ** p<0.001, *** p<0.005, Mann-Whitney.

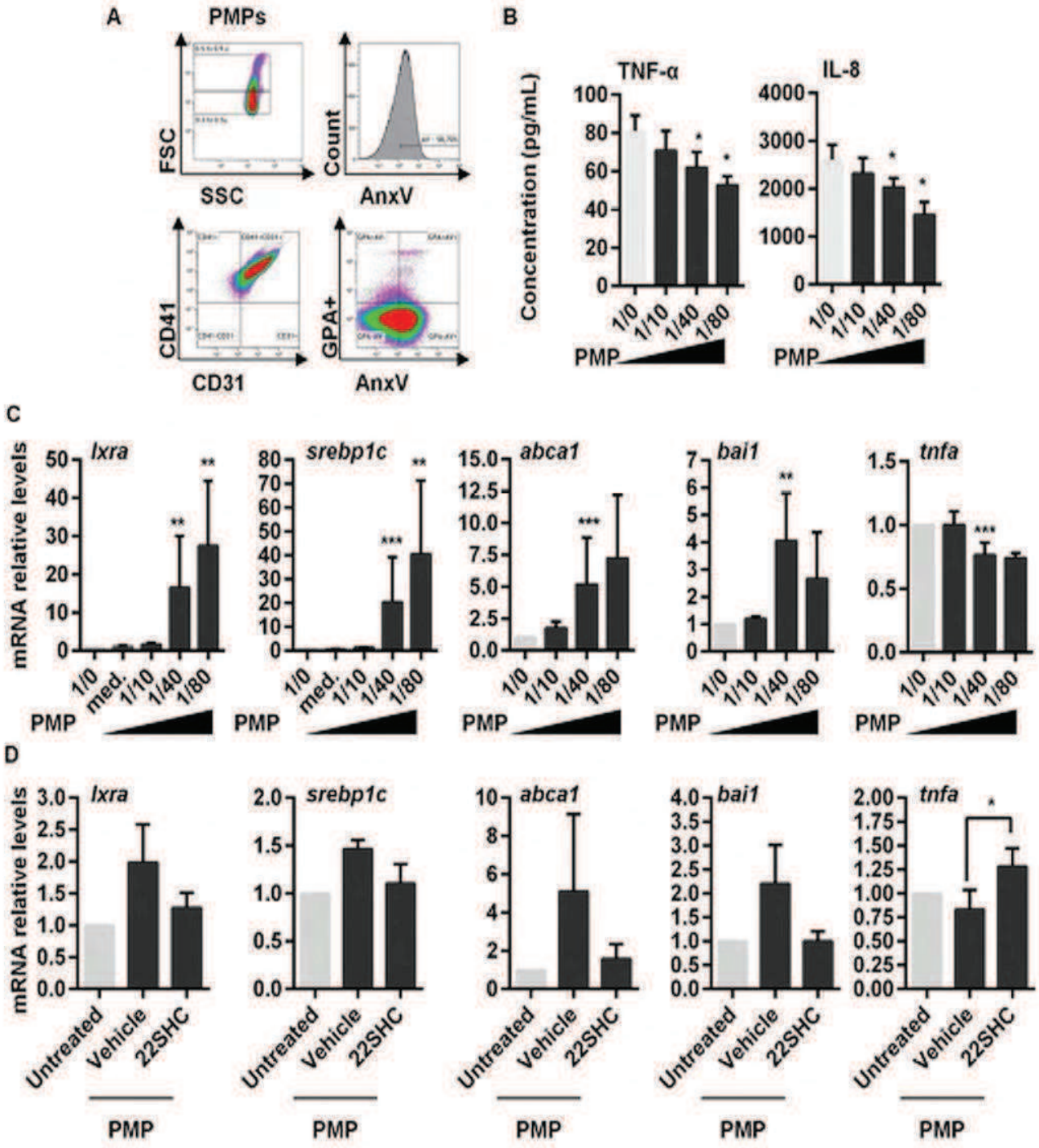

A
PMPs
FSC
SSC
Count
AnxV
CD41
CD31
GPA+
AnxV
B
TNF-α
IL-8
Concentration (pg/mL)
PMP
1/0
1/10
1/40
1/80
C
mRNA relative levels
lxra
srebp1c
abca1
bai1
tnfa
med.
D
Untreated
Vehicle
22SHC

Figure 2: Platelet-derived microparticles reduce PDC pro-inflammatory cytokine secretion and stimulate LXR activation in PDC.

A Flow cytometric characterization and quantification of PMP. MP isolated from platelet concentrates of healthy donors were characterized for PdtSer expression (annexin V [AnxV] staining). In addition to confirm that PMP are derived from platelets and not red blood cells, expression of CD31, CD41 and CD235a was assessed using Navios cytometer (Beckman Coulter). PMP are positive for CD31 and CD41, while are negative for red blood cell marker Glycophorin A (CD235a). Data was acquired with the CXP software, and analyzed with the Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter). Data from one representative experiment out of seven independent productions of PMP. **B** Freshly isolated PDC were cultured with PMP at different PDC:PMP ratio (*i.e.*, without, 1/0; one PDC for 10 PMP, 1/10; one PDC for 40 PMP, 1/40; 1 PDC for 80 PMP, 1/80) for 18 hours. Supernatants from PDC/PMP culture were then collected and assessed for TNF-α and IL-8 using multiplex assays (n=7). **C**. LXR target gene (*lxra, srebp1c, abca1*), *bai1* and *tnfa* mRNA transcripts were quantified by qRT-PCR (n=9). The last wash supernatant of PMP preparation in an equivalent volume of PMP suspension was added to PDC culture as control of lxra and srebp1c mRNA transcript quantification (med. condition). **D.** PDC were treated with the LXR antagonist 22SHC (1 µM) or vehicle (DMSO) for 24 hours. Then, cells were washed and cultured with PMP at a 1:40 PDC:PMP ratio for 18 hours (PMP) or no PMP (Untreated). LXR target gene (*lxra, srebp1c, abca1*), *bai1* and *tnfa* mRNA transcripts were quantified by qRT-PCR (n=4). Data from n independent experiment were expressed as mean ± S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.001$,*** $p<0.005$, Mann-Whitney.

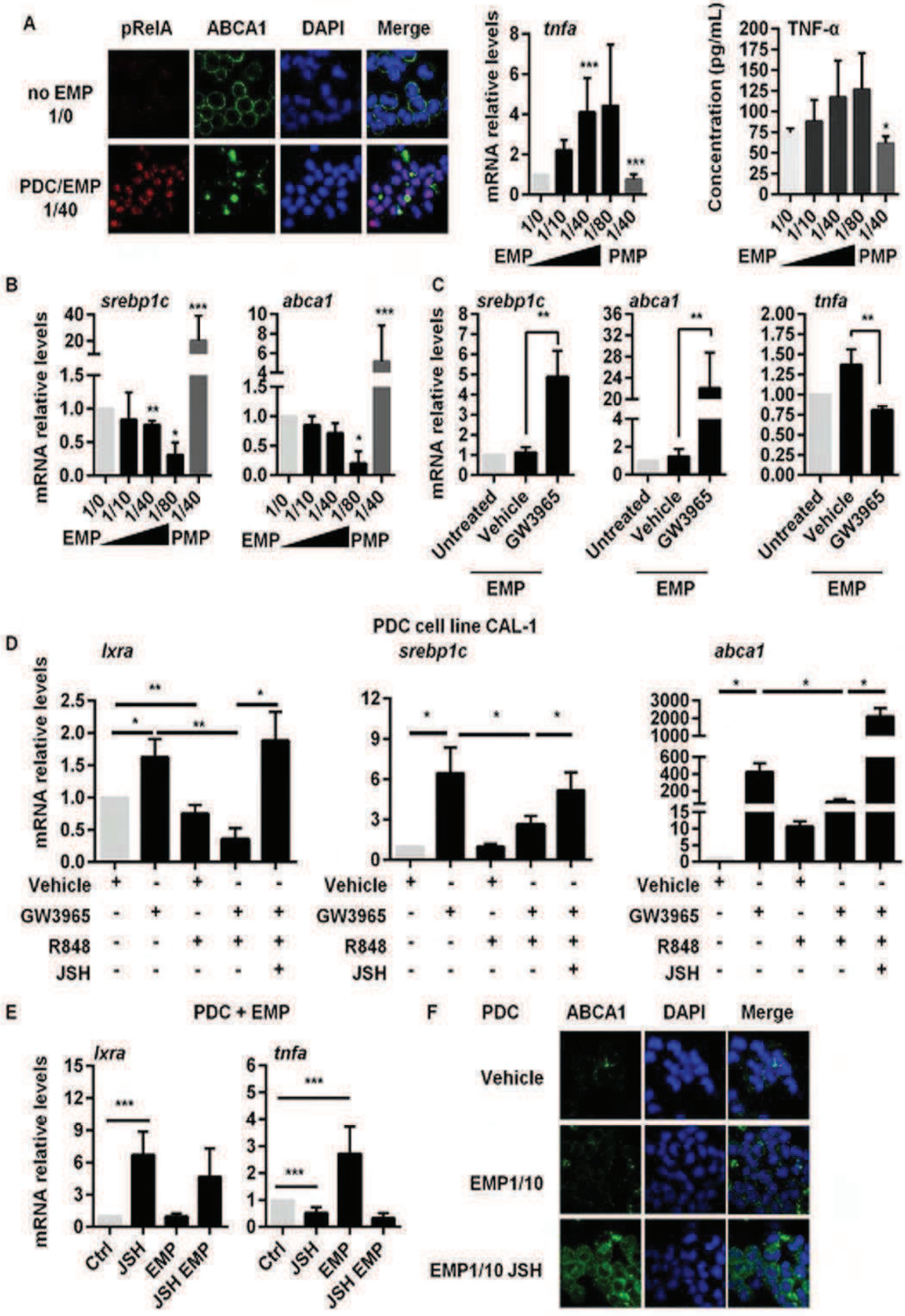

A
pRelA
ABCA1
DAPI
Merge
no EMP 1/0
PDC/EMP 1/40
tnfa
mRNA relative levels
1/0
1/10
1/40
1/80
1/40
EMP
PMP
TNF-α
Concentration (pg/mL)
B
srebp1c
abca1
C
Untreated
Vehicle
GW3965
EMP
D
PDC cell line CAL-1
lxra
srebp1c
abca1
Vehicle
GW3965
R848
JSH
E
PDC + EMP
Ctrl
JSH
EMP
JSH EMP
F
PDC
ABCA1
DAPI
Merge
Vehicle
EMP1/10
EMP1/10 JSH

Figure 3: NF-κB triggering by EMP stimulation or TLR7 activation prevents LXR activation in PDC.

A. Freshly isolated PDC were incubated with EMP at different PDC:EMP ratio (*i.e.*, without, 1/0; one PDC for 10 EMP, 1/10; one PDC for 40 EMP, 1/40; one PDC for 80 EMP, 1/80). Left panel: Nuclear translocation of phosphorylated NF-κBp65 (pRelA) subunit was determined in PDC cultured at a 1/40 ratio for 2.5 hours, by confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI. Of note, EMP stimulation of PDC decreases also membrane ABCA-1 expression. Results from a representative experiment out of 3. Middle panel: *tnfa* mRNA levels from PDC cultured with EMP at the different ratio or with PMP (1/40 ratio) for 18 hours, were quantified by qRT-PCR (n=5). Right panel: TNF secretion from PDC cultured with EMP at the different ratio or with PMP (1/40 ratio) for 24 hours, were quantified by multiplex assays (n=5 for EMP and n=3 for PMP). **B.** PDC were cultured with EMP at different PDC:EMP ratio (*i.e.*, without, 1/0; one PDC for 10 EMP, 1/10; one PDC for 40 EMP, 1/40; one PDC for 80 EMP, 1/80) for 18 hours. LXR target gene (*srebp1c, abca1*) mRNA transcripts were quantified by qRT-PCR (n=5). **C.** PDC were treated with the LXR agonist GW3965 (1 µM) or vehicle (DMSO) for 24 hours. Then, cells were washed and cultured with EMP at a 1:40 PDC:EMP ratio for 18 hours (EMP). Untreated PDC were used as control. Expression of LXR target genes (*lxra, abca1*), and *tnfa* gene were quantified by qRT-PCR (n=5). **D.** Cells from PDC cell line CAL-1 were treated with GW3965 (1 µM), R848 (1 µg/mL), JSH-23 (JSH, 25 µM), or a combination of these treatments for 18 hours. LXR target gene (*lxra, srebp1c, abca1)* mRNA transcripts were quantified by qRT-PCR (n=5). **E**. Freshly isolated PDC were treated for 18 hours with the NF-κB inhibitor, JSH-23 (JSH), with or without EMP at a PDC:EMP ratio of 1:40. Expression of LXR target gene (*lxra)* and inflammatory cytokine (*tnfa*, *il6 [not depicted])* gene mRNA was quantified by qRT-PCR (n=3). **F**. PDC were treated with the NF-κB inhibitor JSH-23 (JSH) with or without EMP (at a PDC:EMP ratio of 1:10, EMP/1:10) for 2.5 hours. Membrane ABCA1 expression was analyzed by confocal microscopy (one representative experiment out of 3 using PDC from 3 different donors). Data from n independent experiments were expressed as mean ± S.E.M. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.005$, Mann-Whitney.

Supplemental Methods

Cell isolation. Blood samples were collected from healthy donors after regulatory approval of the French Ministry of Higher Education and Research (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, agreement number #AC-2015-2408, May 22th 2015). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors (EFS B/FC, Besançon, France) were isolated by Ficoll gradient density centrifugation using Ficoll-Paque (Velizy- Villacoublay, France). Plasmacytoid DCs (PDC) were isolated using Diamond PDC Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's recommendations. After isolation, PDC purity was controlled by cytometry after CD123/BDCA-2 monoclonal antibody (mAb) staining (Supplemental Table 1). The purity of isolated PDC was between 94 to 98%.

Cell culture. PDC isolated from healthy volunteers and the human leukemic PDC cell line CAL-1,[1] obtained from Dr Maeda (Nagasaki University, Japan), were cultured in complete medium consisting in RPMI 1640 Glutamax medium (InVitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% (vol/vol) heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Invitrogen) and 1% Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL, Life Technologies, Gaithersburg, MD). Culture medium was always supplemented with recombinant human IL-3 (10 ng/mL, PeproTech, London, UK). Cells from the human microvascular endothelial cell line (HMEC-1) were cultured in MCDB 131 medium (InVitrogen) supplemented with 10% (vol/vol) heat inactivated FCS, 1% Penicillin-Streptomycin (10000 U/mL), epidermal growth factor (EGF, 10 ng/mL, Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and Hydrocortisone (3 nM, Sigma Aldrich).

Microparticle production and isolation. Microparticles derived from HMEC-1 (referred as, EMP) were generated and isolated, as previously described.[2] Briefly, when HMEC-1 cells reached 80% of confluence, TNF-α (50 ng/mL, PeproTech) was added and culture was performed for 24 h. Cell culture supernatants were collected and cleared from detached cells and cell fragments by centrifugation at 1200*g* for 5 min. Supernatant was then centrifuged twice at 15000*g* for 90 min at 4°C. Pelleted EMP were resuspended in culture media and used immediately or stored until 3 weeks at 4°C before use, as previously described.[2]
Platelet-derived microparticles (PMP) were isolated from platelet concentrates (EFS B/FC) obtained from healthy donors after written informed consent. Platelets were removed by two centrifugations at 2500*g* 15 min at room temperature (RT). Supernatants were collected and ultracentrifuged twice (15000*g*, 90 min, 4°C) to isolate PMP that were used or stored in same conditions than EMP.[2] Quantification of MP was performed by flow cytometry using a Navios cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France), Megamix plus™ (BioCytex, Marseille, France) to assess MP size and MP number was calculated on the basis of the known number of Cytocount® beads (Dako, Trappes, France) added to the sample. Identification of MP was performed after staining with fluorochrome-conjugated mAbs (Supplemental Table 1). Expression of phosphatidylserine by MP was assessed by cytometry using FITC- conjugated Annexin-V (AnxV, Beckmann Coulter).

Evaluation of plasmacytoid dendritic cell responses. Functional expression of LXR by human PDC was assessed by using both LXR agonists (T0901317, GW3965[3] or 22RHC [22-R-hydroxycholesterol]) or antagonist (22-S-hydroxycholesterol, 22SHC[4]) (Sigma Aldrich) and then, by analyzing induction of LXR target genes (see below) or expression of LXR (*lxra* and *lxrb*) isoform mRNA, assessed by qRT-PCR (Figure S1). ABCA-1 protein expression was assessed by confocal microscopy. Concentrations of LXR agonists or antagonist used were defined to avoid PDC death as assessed by AnxV and 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, BD Bioscience) staining and flow cytometry. To assess the effects of LXR activation on innate PDC functions, freshly isolated PDC were stimulated with LXR agonist/antagonist for 24 h, and then, by either Toll-like receptor (TLR)7 ligand R848 (1 µg/ml, Invivogen, Toulouse, France), or TLR9 ligands, CpG-A (2 µmol/L, ODN2216, Invivogen) for additional 6 h (for mRNA analysis) or 18 h for (protein analysis).

To assess the effects of MP on PDC functions, EMP or PMP were added to PDC at different PDC to MP ratio (1:10, 1:40, 1:80) for 18 hours. Maturation of PDC was assessed by expression of maturation marker CD83 or costimulatory molecules by cytometry and cytokine production (at protein levels by ELISA, multiplex assay or intracellular staining/cytometry and at mRNA levels by transcript quantification). Internalization of MP by PDC was also assessed using labeled-MP (see below). Prevention of NF-kB activation in PDC was performed using JSH-23 (25 µM, Sigma Aldrich), a NF-kB p65 nuclear translocation inhibitor.[5]

Flow cytometry and antibodies. For PDC analysis, flow cytometry was performed with a CANTO II cytometer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) using the DIVA 6.1 software (BD Biosciences). Fluorochrome-conjugated isotype control mAbs from the different mAb providers were used. Monoclonal antibodies used for cytometry and other cytometry reagents are described in supplemental table 1.

Cytokine production. Culture supernatants were collected from PDC after LXR ligand stimulation (24 h) followed or not by TLR ligand (18 h), or after stimulation by EMP or PMP (18 h). The multiplex DIAplex technology (Diaclone, Besançon, France) was used to measure the following cytokines: TNF-α, IL-10, IL-6 and IL-8. The human IFN-alpha Platinum ELISA kit (eBioscience SA, Paris, France) was used to measure IFN-α. The minimal detectable concentrations were as follows: 1.7 pg/mL, 1.3 pg/mL, 1.4 pg/mL, 9.8 pg/mL and 15 pg/ml for IL-10, IL-8, IL-6, TNF and IFN-α, respectively. Production of IFN-α, IL-6 and TNF-α by PDC was also determined by flow cytometry and intracellular staining using anti- IFN-α, anti-IL-6 and anti-TNF-α mAb, respectively (Supplemental Table 1). Brefeldin A (10 µg/ml, Sigma Aldrich) was added during the last 3 h before the end of activation with TLR ligands or MP. Staining was performed according to the manufacturer's instructions on fixed and permeabilized cells (cytofix/cytoperm Plus kit, BD Biosciences).

Microparticle internalization. Microparticle uptake was assessed by cytometry, as described.[2] Microparticles (EMP or PMP) were labeled with either CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Thermo Scientific™, Fontenay-sous-Bois, France) or eFluor proliferation dye v450 (eBioscience) according to the manufacturers' instructions, and then, incubated at different ratio (see above) with freshly isolated PDC. Internalization was blocked before labeled-MP addition by pre-incubation (30 minutes) of MP with unlabeled AnxV (BD Biosciences), or PDC pre-incubation (1 hour) with either anti-BAI-1 mAb or anti-Mer-TK polyclonal antibody (R&D Systems, Lille, France), control isotype irrelevant mAb or polyclonal antibody (R&D Systems). Effects of LXR agonists on MP internalization were assessed by incubating PDC, with either T0901317 or GW3965 24 h prior addition of labeled-MP.

Quantitative RT-PCR analysis. Quantitative RT-PCR analysis was used to evaluate functionally LXR expression by measuring LXR-target gene expression *(i.e.*, *lxra*, *abca1* and *srebp1c*) and confirm the effects of LXR agonists or MP on LXR target gene, endocytosis receptor or cytokine gene expression. Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). One to 2 µg of RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Then, cDNA were quantified by real time RT-PCR using either the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) or the Taqman Universal Buffer II (Applied Biosystems) on a CFX96 Real-Time device (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Relative mRNA levels were determined using the ΔΔCt method. Values were expressed relative to *gapdh* levels. The sequences of the oligonucleotides used are described in supplemental table 2.

Confocal microscopy.
CAL-1 cells or freshly isolated PDC were incubated with LXR agonist for 24 h before CD123 and ABCA1 analysis. Phosphorylated NF-κB p65 (pRelA) analysis was performed after LXR treatment

of PDC followed by R848 stimulation for 45 min. PDC stimulated with MP were directly stained for ABCA1 or pRelA. Cells were collected in cold PBS solution, washed and immobilized onto glass microscope slides by Cytospin's centrifugation (1000 rpm, 5 min, RT). Then, cells were fixed and permeabilized in a methanol bath (20 min at -20°C), washed 3 times and incubated, overnight at +4°C, with the primary antibody (Supplementary Table 3). Slides were washed 3 times with 0.5% FCS/PBS solution, and incubated 1 h with Alexa fluor 555-conjugated Goat anti-mouse IgG (H+L) or Alexa fluor 488-conjugated Goat anti- Rabbit IgG (H+L) antibody (Supplementary Table 3). Slides were washed and mounted with Mounting Media with DAPI (Sigma Aldrich). Fluorescent images were acquired on an FV1000 confocal microscope (Olympus, Rungis, France) and analyzed with Olympus FV- viewer software.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1. Reagents used for cytometry analysis

mAbs directed against:	Fluorochrome	Providers	Reference #
CD83	PE	BD	556855
CD80	APC-H7	BD	561134
HLA-DR	FITC	Diaclone	857.031.010
CD40	PerCPCy5.5	BioLegend	334316
CD123	PE-Cy7	Biolegend	306010
BDCA2	APC	Miltenyi Biotec	130-090-905
CD86	V450	BD	560357
IFN-α	PE	Miltenyi Biotec	130-092-601
IL-6	FITC	Biolegend	501104
TNF-α	PerCPCy5.5	eBioscience	45-7349-42
Navios Microparticle analysis			
CD41	PE-Cy7	Beckman Coulter	6607115
CD31	PE	Beckman Coulter	IM2409
Glycophorin A (CD235a)	PE-Cy7	Beckman Coulter	A71564
Annexin V	FITC	Beckman Coulter	100406-02
Binding Buffer		Beckman Coulter	10045-01
Megamix Plus^{TM}		BioCytex	7802
CYTOcount®		DAKO	S2366

Supplemental Table 2 Reagents for quantitative RT-PCR analysis.

SYBR Green Assay (Eurofins mwg/operon)	
Target	Sequence (5'->3')
abca1 forward	GCACTGAGAGATGCTGAAA
abca1 reverse	AGTTCCTGGAAGGTCTTCAC
srebp1c forward	GACATCGAAGACATGCTTCAGCT
srebp1c reverse	GACATCGAAGACATGCTTCAGCT
lxra forward	ACTCGAAGCCGGTCAGAAA
lxra reverse	GAAGAAACTGAAGCGGCAAGA
lxrb forward	AGATGTTGATGGCGATGAGCA
lxrb reverse	TGCCTGGTTTCCTGCAGCT
gapdh forward	ACATCATCCCTGCCTCTACTG
gapdh reverse	ACCACCTGGTGCTCACTGTA
Gene	Assay on demand reference # (Applied Biosystem)
il-6	Hs00985639_m1
tnfa	Hs01113624_g1
bai1	Hs00181777_m1
mertk	Hs01031973_m1
tim1	Hs00273334_m1
tim4	Hs00293316_m1
stabilin2	Hs00213948_m1
ifna1	Hs00356648_s1
gapdh	4352934E

Supplemental Table 3, Reagents used for confocal microscopy

Antibody against:	Reference #	Providers
CD123	555642	BD Biosciences
ABCA1	NB400-105	Novus
Phosphor-S536 p65 (RelA) NF-κB subunit	5583977	BD Biosciences
Alexa fluor 555-conjugated Goat anti-mouse IgG (H+L)	A21422	Life technologies
Alexa fluor 488-conjugated Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	A11008	Life technologies

Supplemental Figures

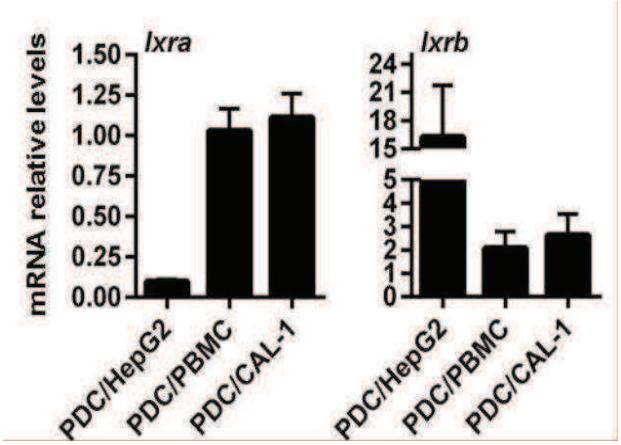


Figure S1. Freshly isolated plasmacytoid dendritic cells express preferentially the ubiquitous isoform *lxrb* mRNA.

Lxra and *lxrb* mRNA levels were evaluated in freshly isolated untreated PDC by qRT-PCR. The mRNA relative levels of PDC samples (n=24 and n=5 for *lxra* and *lxrb*, respectively) were compared to the mean of HepG2 hepatoma cell line (a control for *lxra*), PBMC or CAL-1 PDC cell line (n=4, n=4 and n=12, respectively). PDC express lower levels of lxra mRNA than HepG2 and similar levels of lxr isoforms than PBMC and CAL-1 cells.

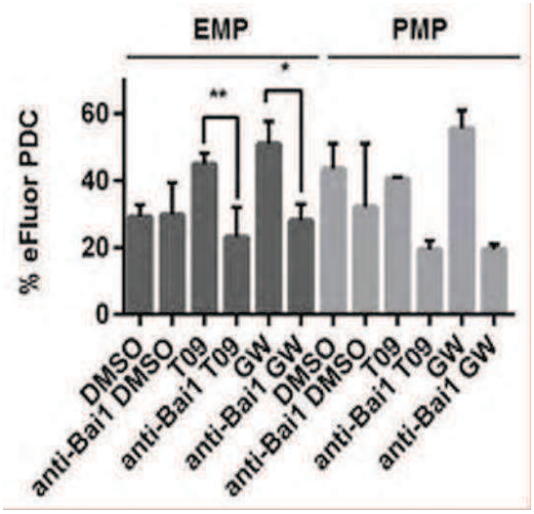


Figure S2. Stimulation of LXR pathway in freshly isolated plasmacytoid dendritic cells upregulates microparticle internalization *via* BAI-1, whatever the microparticle origin.

PDC were treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 hours. Then, cells were cultured for 1 hour with neutralizing anti-BAI-1 antibody (α-BAI-1) or control antibody, before adding eFluor-labeled EMP or PMP for 4 h and analyzing by cytometry. (n=4 and 2 for EMP and PMP respectively). Cumulative data of 4 or 2 independent experiments expressed as mean $\pm$ S.E.M. of eFluor$^+$ PDC are shown. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Mann-Whitney.

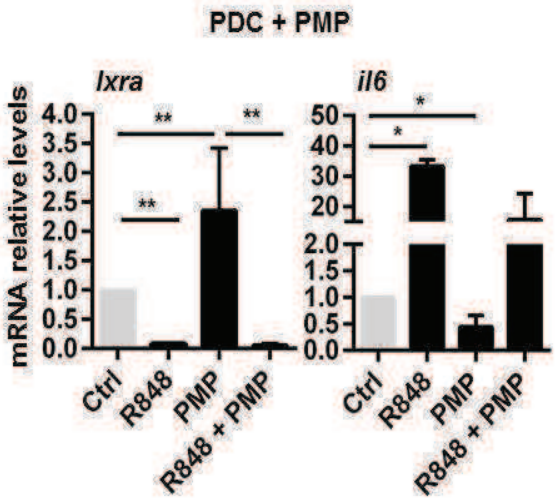


Figure S3: NF-κB triggering by TLR7 activation prevents platelet-derived microparticle-induced LXR activation in freshly isolated plasmacytoid dendritic cells.

Freshly isolated PDC were treated for 18 hours with R848 (1 µg/mL), PMP at a PDC:PMP ratio of 1:40, or with R848 plus PMP. Expression of LXR target gene (*lxra*) and inflammatory cytokine (*il6*) gene mRNA was quantified by qRT-PCR (n=3). Data were expressed as mean ± S.E.M. of 3 independent experiments. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, Mann-Whitney.

Supplemental References

1. Maeda T, Murata K, Fukushima T, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int. J. Hematol.* 2005;81:148–154.

2. Angelot F, Seilles E, Biichle S, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica*. 2009;94:1502–1512.

3. Bennett DJ, Cooke AJ, Edwards AS. Non-steroidal LXR agonists; an emerging therapeutic strategy for the treatment of atherosclerosis. *Recent Patents Cardiovasc. Drug Discov.* 2006;1:21–46.

4. Hessvik NP, Bakke SS, Smith R, et al. The liver X receptor modulator 22(S)- hydroxycholesterol exerts cell-type specific effects on lipid and glucose metabolism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012;128:154–164.

5. Shin H-M, Kim M-H, Kim BH, et al. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF-kappaB without affecting IkappaB degradation. *FEBS Lett.* 2004;571:50–54.

2. Données complémentaires à l'étude

Parallèlement à l'effet des agonistes LXR sur les PDC issues de volontaires sains, nous avons aussi montré que la lignée LPDC CAL-1 répondait aussi à cette stimulation, avec l'induction de la transcription des gènes cibles de LXR (*srebp1c* et *abca1*) et l'inhibition par l'antagoniste 22SHC (Figure 23).

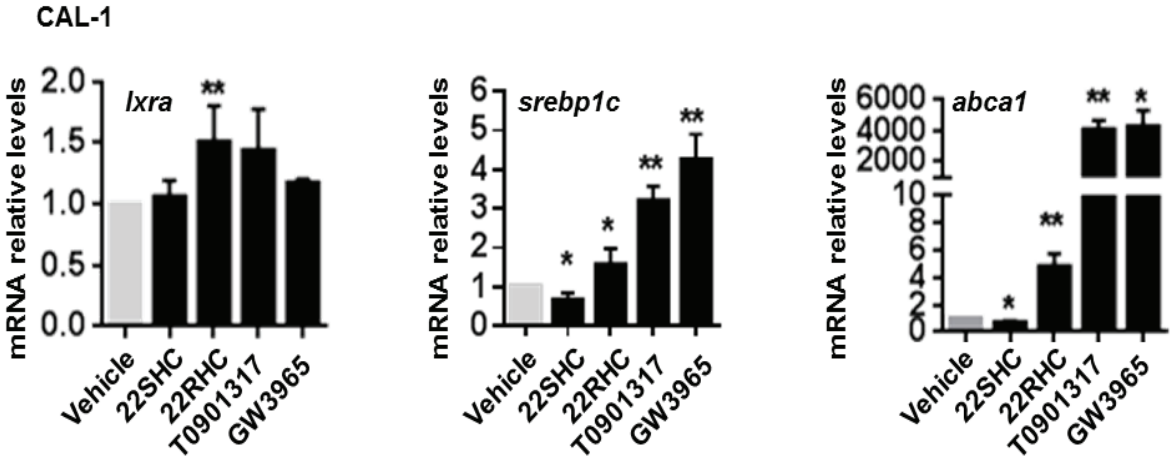


Figure 23 – Les cellules CAL-1 expriment un LXR fonctionnel
Les cellules CAL-1 ont été stimulées 24h avec différents agonistes LXR, T0901317 (T09), GW3965 (GW), 22RHC et l'antagoniste 22SHC (tous à 1µM). L'expression des gènes cibles de LXR (*lxra*, *srebp1c* et *abca1*) a été évaluée par qRT-PCR. Résultats de 4 expériences indépendantes exprimés comme la moyenne + S.EM, * p<0.05, ** p<0.01, Mann-Whitney.

Lorsque nous nous sommes intéressés à l'internalisation des MP par les récepteurs aux PS, nous avons analysé par qRT-PCR l'expression des différents récepteurs en la comparant avec celle de cellules phagocytaires : DC dérivées des monocytes et macrophages. L'expression des ARNm des récepteurs est faible par rapport aux autres cellules analysées (Figure 24A). Contrairement à l'effet observé de la stimulation de la transcription de *bai1* par les agonistes LXR (Figure 1F de l'article), l'activation de la voie LXR dans les PDC n'augmentait pas l'expression de l'ARNm de *tim4* ou *mertk* (Figure 24B). Nous avons aussi analysé l'expression de ces transcrits par la lignée CAL-1 et l'effet de la stimulation de la voie LXR ou son inhibition (Figure 24B). Bien que des variations significatives soient observées, la lignée CAL-1 n'internalise pas les MP (Figure 24C). Enfin, nous présentons les résultats concernant l'absence d'effet du blocage de la voie Mertk sur l'internalisation des MP marquées (Figure 24D), contrairement à ce qui est observé dans la Figure 1G-H dans l'article avec le blocage de BAI1.

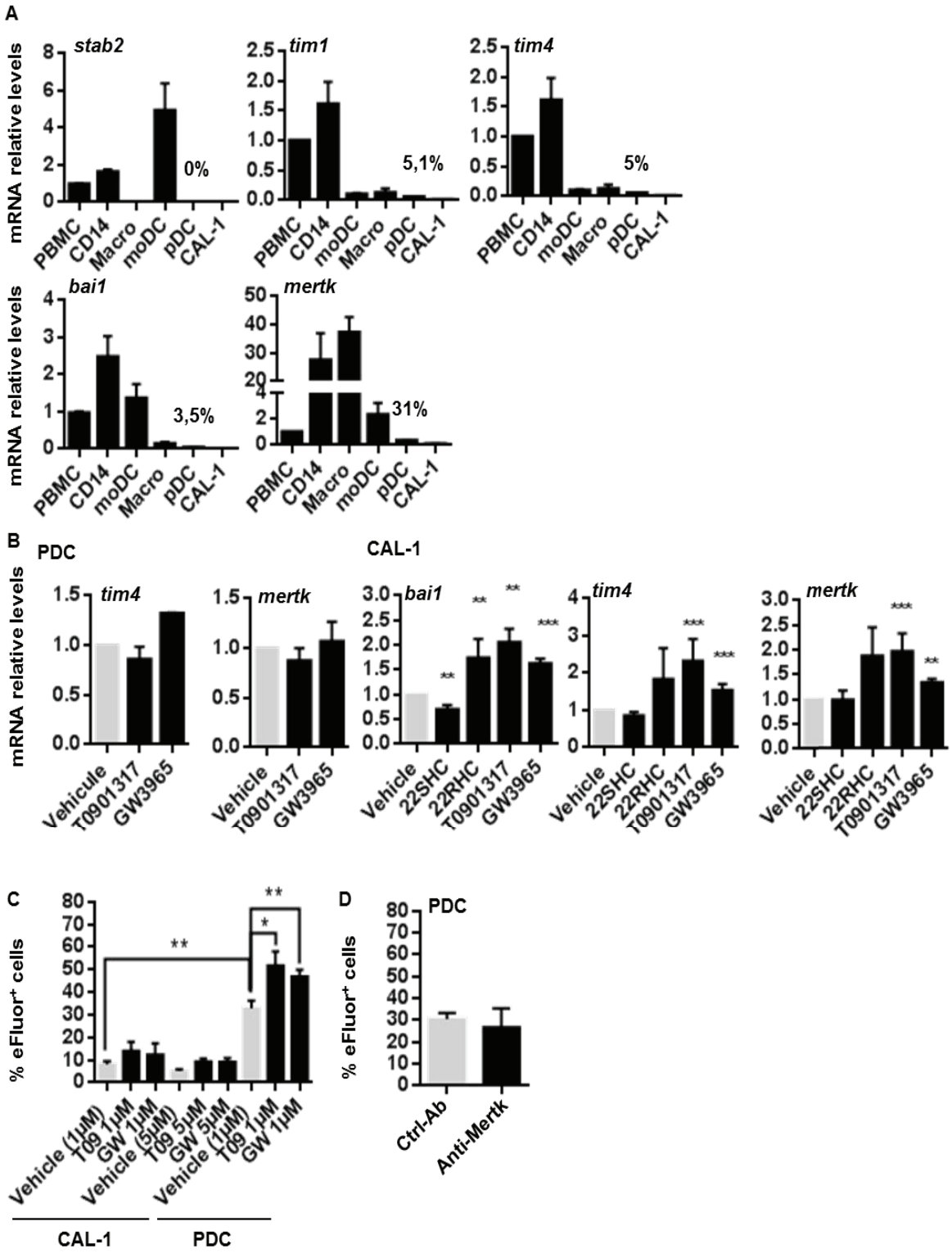


Figure 24 - Expression des récepteurs aux phosphatidylsérines et effet de la stimulation LXR sur les PDC et CAL-1

A. Des PBMC, monocytes (Mono), macrophages (Macro) et cellules dendritiques dérivées de monocytes (moDC), PDC provenant de donneurs sains, ainsi que les cellules CAL-1 ont été évaluées pour leur expression de *stab2*, *tim1*, *tim4*, *bai1* et *mertk* par qRT-PCR (n=3). B. Des CAL-1 (panel de droite) et des PDC (panel de gauche) ont été traitées pendant 24h avec les agonistes LXR T0901317, GW3965 ou 22RHC, ainsi que l'antagoniste 22SHC pendant 24h. L'expression de *bai1*, *tim4*, *mertk* a été évaluée par qRT-PCR (n=5). C. Des PDC ou des CAL-1 ont été traitées pendant 24h avec T0901317 (T09), GW3965 (GW) ou le solvant contrôle pour un volume équivalent à celui des agonistes (vehicle). Des MP marquées à l'eFluor ont alors été ajoutées à la culture pour un rapport de 1PDC/40MP, 4 heures d'incubation. L'internalisation des MP par les PDC ou CAL a été appréciée par le % de cellules fluorescentes, par cytométrie en flux (n=3 pour les CAL-1 et n=10 pour les PDC). D. Des PDC ont été traitées pendant 1h avec un anticorps bloquant de Mertk (Anti-Mertk) ou un anticorps contrôle (Ctrl-Ab). Des MP marquées à l'eFluor ont alors été rajoutées à la culture pour un rapport de 1PDC/40MP, 4 heures d'incubation. L'internalisation des MP a été évaluée par le % de cellules fluorescentes

Les données représentent la moyenne des 4 expériences ± S.EM, * p<0,05 ; ** p<0,01, Mann-Whitney.

Etude 2 : Les Liver X receptor (LXR), comme nouvelle cible thérapeutique dans la leucémie à cellules dendritiques plasmacytoides (BPDCN)

La BPDCN est une leucémie rare et agressive dérivée des PDC (415). Bien qu'une bonne réponse aux chimiothérapies soit observée initialement, les rechutes sont fréquentes faisant intervenir des cellules chimio-résistantes (633). De ce fait, la BPDCN est associée à un mauvais pronostic, avec une survie globale moyenne allant jusqu'à 32 mois, quel que soit le traitement. A l'heure actuelle, il n'y a pas de consensus sur la prise en charge thérapeutique des patients (421). Les cellules malignes sont caractérisées par un défaut de l'homéostasie du cholestérol (186). Effectivement, plusieurs types de cellules cancéreuses présentent une augmentation de la capture du cholestérol exogène (*via* la surexpression et le maintien à la membrane des récepteurs aux lipoprotéines, LDLR ou VLDLR) (175,176), une augmentation de la biosynthèse du cholestérol (175), ainsi qu'une diminution de l'efflux du cholestérol (632). Dans des progéniteurs hématopoïétiques murins, l'efflux du cholestérol inhibe la prolifération cellulaire, en réponse au facteur de croissance IL-3 (634). De manière intéressante, l'IL-3 a été décrit comme un facteur de survie des BPDCN *in vitro* (415). Physiologiquement, l'homéostasie du cholestérol est régulée par les « *Liver X Receptors »* (LXR). Ils sont capables de réduire l'entrée du cholestérol dans la cellule (par dégradation des récepteurs au LDL et VLDL (631)), d'augmenter l'efflux cellulaire (*via* une augmentation de l'expression d'ABCA1 et ABCG1, ainsi que de l'apolipoprotéine ApoE), mais aussi par inhibition de la synthèse de cholestérol endogène (inhibition de FDFT1 et CYP51A1 entrainant l'inhibition de HMGCR). (121,133,631,635). Les agonistes LXR ont révélé un grand intérêt thérapeutique dans plusieurs pathologies malignes, dont des leucémies (186). L'activation des LXR interfère avec de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire pouvant être induites par des facteurs exogènes.

Nous nous sommes donc intéressés au profil d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, régulés par LXR et du gène *nfkb1,* dans 13 échantillons de BPDCN, en comparaison à 63 LAM, 32 LAL et 5 PDC issues de donneurs sains. Nous avons montré par analyse transcriptomique que les 13 BPDCN sont contiguës dans l'arbre d'analyse. Ceci atteste d'une dérégulation de l'expression des transcrits, traduisant une diminution de l'expression des gènes cibles de LXR et une augmentation du gène *vldlr* et *nfkb1*. Cette signature transcriptomique de BPDCN est différente de celle des PDC. L'analyse génomique de ces échantillons de BPDCN ne montrait cependant pas de mutation des gènes codant pour les deux isoformes LXRα et LXRβ. L'utilisation d'agonistes LXR (T091317 et GW3965) nous a permis de montrer dans 3 lignées différentes de

BPDCN (CAL-1, GEN2.2 et BES-1), ainsi que 5 échantillons de BPDCN issus de patients, une augmentation de la mort cellulaire et une inhibition de la prolifération des BPDCN *in vitro*. Nous avons validé par qRT-PCR que ces effets étaient associés à une augmentation des transcrits codant pour les molécules d'efflux du cholestérol ABCA1 et ABCG1. De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression d'ABCA1 membranaire, ainsi que de l'efflux du cholestérol par les cellules CAL-1. L'appauvrissement des cellules en cholestérol a été démontré dans des fibroblastes comme inhibant la prolifération cellulaire par la régulation de l'expression de la cycline D1 (636). Cette protéine a également été décrite comme régulée par STAT5 (637). Nous avons montré ici que l'activation de STAT5 par l'IL-3 dans les LPDC était inhibée par un prétraitement agoniste LXR. De même, les agonistes des LXR inhibaient la phosphorylation d'Akt, intermédiaire de signalisation impliqué dans la survie cellulaire. L'analyse du profil d'expression génique a révélé une surexpression du gène *nfkb1*, permettant la synthèse de la protéine NF-κB p105 (précurseur de la forme active p50). La voie NF- κB a été décrite comme suractivée dans la BPDCN et participant à la prolifération et la survie des cellules (422). Nous démontrons ici que les agonistes LXR inhibent la voie NF-κB par inhibition de la transcription de *nfkb1*, une inhibition de la phosphorylation du partenaire protéique p65 (RELA), ainsi qu'une inhibition de la translocation nucléaire des sous-unités de NF-κB p65, p50 et cREL.

Une étude *in vivo*, utilisant un modèle murin de xénogreffe de BPDCN nous a permis de démontrer que les agonistes LXR diminuaient les infiltrats spléniques et médullaires par les LPDC, ainsi que de prévenir la cytopénie induite par la leucémie.

En conclusion, les cellules de BPDCN montrent un profil spécifique de sous-activation de la voie LXR. La stimulation de cette voie par des agonistes a montré une restauration de l'expression des transcrits de certaines protéines (ABCA1/ABCG1) associée à un effet anti-leucémique *in vitro* et *in vivo,* impliquant au moins 3 mécanismes distincts : l'efflux du cholestérol, l'inhibition de la signalisation induite par l'IL-3 et de la voie NF-κB.

Ces résultats démontrent un effet thérapeutique des agonistes LXR dans la BPDCN.

1. Article *(manuscript in preparation)*

Title: Cholesterol homeostasis restoration by LXR agonists as treatment for blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Authors: A. Ceroi[1,2,3,4], D. Masson[4,5], A. Roggy[1,2,3,4], C. Roumier[6], C. Chagué[1,2,3,4], L. Philippe[1,2,3,4], B. Lamarthée[1,2,3,4†], F. Angelot-Delettre[1,2,3,4], F. Bonnefoy[1,2,3,4], S. Perruche[1,2,3,4], S. Biichle[1,2,3], C. Preudhomme[6], E. Macintyre[7], L. Lagrost[4,5], F. Garnache-Ottou[1,2,3,4], P. Saas[1,2,3,4*]

Affiliations:

[1]INSERM U1098, F-25000 Besançon, France;

[2]Université de Bourgogne Franche-Comté, UMR 1098, F-25000 Besançon, France;

[3]EFS Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France;

[4]LabEx LipSTIC, Besançon/Dijon, France ;

[5]INSERM U866, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France;

[6]INSERM U837, CHRU, Lille, IRCL Laboratoire d'Hématologie, Centre de Biologie Pathologie, F-59000 Lille, France;

[7]INSERM U1151, Université Sorbonne Paris Cité, Faculté de Médecine Descartes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Laboratoire d'Onco-Hématologie, F-75000 Paris, France.

*To whom correspondence should be addressed: Prof. P Saas, INSERM UMR1098, EFS BFC, 8 rue JFX Girod, BP1937, F-25020 Besançon Cedex, France. Phone: +33 3 81 61 56 15; FAX: +33 3 81 61 58 00; E-mail: philippe.saas@efs.sante.fr

†Current address: INSERM, UMRs 938, Université Pierre et Marie Curie, F-75000 Paris, France

One Sentence Summary: Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) exhibits a specific gene signature with dysregulation of genes involved in cholesterol homeostasis that are normalized by liver X receptor agonist treatment and associated with inhibition of BPDCN cell proliferation and survival linked to increasing cholesterol efflux, inhibition of NF-κB activation and interference with IL-3 signaling pathway.

Abstract: Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is an aggressive hematological malignancy with a poor prognosis that derives from plasmacytoid dendritic cells (PDC). No consensus for optimal treatment modalities is available today and their full characterization is emerging. We identified here a BPDCN-specific transcriptomic profile when compared to those of acute myeloid leukemia and T-acute lymphoblastic leukemia, as well as the transcriptomic signature of primary PDC. This BPDCN gene signature identified a dysregulation of genes involved in cholesterol homeostasis, some of them being liver X receptor (LXR) target genes. LXR agonist treatment of BPDCN cells restored LXR target gene expression and increased cholesterol efflux via the upregulation of ATP Binding Cassette (ABC) transporters, ABCA1 and ABCG1. LXR agonist treatment was also responsible for limiting BPDCN cell proliferation and inducing apoptotic cell death. LXR activation in BPDCN cells was shown to interfere with three signaling pathways associated with leukemic cell survival: NF-κB activation, as well as Akt and STAT5 phosphorylation in response to the BPDCN growth/survival factor IL-3. These effects were increased by cholesterol efflux stimulation through lipid acceptor, apolipoprotein A1. In vivo experiments using a mouse model of BPDCN cell xenograft revealed a decrease of leukemic cell infiltration and BPDCN-induced cytopenia after LXR agonist treatment. Overall, our data identify an unrevealed perturbation of cholesterol homeostasis in BPDCN and a new potent therapeutic approach based on LXR agonists.

Introduction

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN) is an aggressive malignancy derived from plasmacytoid dendritic cells (PDC)(1). Currently, there is no consensus regarding the optimal treatment modality. Most BPDCN patients exhibiting a very aggressive clinical course with limited median overall survival from 9 to 32 months (2). After an initial response to treatment whatever the chemotherapy regimens used, relapse quickly occurs and recurrent disease becomes generally resistant to chemotherapy (3). BPDCN was recently classified by the World Health organization (WHO) as a distinct entity in the group of “acute myeloid leukemia (AML) and related precursor neoplasms” (4). However, extensive characterization of this malignancy is limited in terms of ontogeny, phenotype and molecular profiling. Diagnosis overlap may exist with immature AML, monoblastic and undifferentiated leukemia. Thus, a better understanding of this leukemia and new therapeutic approaches are urgently needed.

Previous studies have identified a cholesterol metabolism dysregulation in malignant cells leading to intracellular cholesterol accumulation (5–9). Intracellular cholesterol content is controlled by

cholesterol entry, biosynthesis and efflux. Cholesterol entry is dependent on plasma lipoprotein uptake (mainly low density lipoprotein [LDL] and very low density lipoprotein [VLDL]) through their specific receptors LDLR and VLDLR, respectively. Thus, leukemic cells from myeloid origin (AML and chronic myeloid leukemia [CML]) have been shown to increase LDLR expression (10), and decrease LDLR degradation (11). Cholesterol efflux can involve the two ATP Binding Cassettes (ABC) A1 and G1 (ABCA1 and ABCG1, respectively) in association with apolipoprotein cholesterol acceptors including apolipoprotein A1 [APOA1] and apolipoprotein E [APOE], respectively, or lipidated lipoprotein particles (such as, nascent HDL or HDL2) (12).

In myeloid leukemia cells, cholesterol biosynthesis was also increased (10), resulting in cholesterol accumulation. Intracellular cholesterol content regulates critical functions in normal cells. For instance, ABCA1/G1-induced cholesterol efflux has been shown to inhibit hematological progenitor cell proliferation in response to IL-3 stimulation (13, 14). Interestingly, BPDCN cells express high levels of IL-3 receptor (IL-3R) alpha chain (CD123), and IL-3 is involved in BPDCN survival (1, 16). Whether cholesterol homeostasis is dysregulated in BPDCN and may participate in its aggressiveness or be harnessed for therapeutic purposes remains to be determined.

Liver X receptors (LXR) regulate cholesterol homeostasis and interfere with several signaling pathways. These nuclear receptors are expressed as two isoforms, with the LXRβ isoform being ubiquitously expressed while LXRα expression is limited to cells with high cholesterol turnover, such as hepatocytes or macrophages (16, 17). LXR pathway is activated by endogenous oxidized cholesterol derivatives (such as oxysterols) or by synthetic agonist stimulation (e.g., T0901317 or GW3965). LXR agonists are considered to be a treatment of different diseases (18). LXR activation upregulates the expression of several genes involved in cholesterol homeostasis (called LXR target genes), including: SREBF1, LXRA, ABCA1, ABCG1 or APOE. These three latter genes encode proteins involved in cholesterol efflux. LXR stimulation induces expression ABCA1 and ABCG1 (18), as well as APOE that promotes cholesterol efflux through ABCA1 in an autocrine manner in macrophages (19). Moreover, LXR stimulation induces LDLR and VLDLR degradation (through Inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor, also called IDOL) (20), preventing cholesterol uptake (20, 21). These mechanisms decrease intracellular cholesterol content. A previous study from our laboratory demonstrated that LXR are functionally expressed in normal PDC and in a leukemic PDC cell line (22). No data are available about the effects of LXR agonists on BPDCN and whether this can be a therapeutic approach.

The initial goal of this study was to determine whether BPDCN were characterized by a specific gene signature based on genes involved in cholesterol efflux and uptake in comparison with other leukemic cells (AML and T acute lymphoblastic leukemia [T-ALL]) and with normal PDC. Among these genes involved in cholesterol homeostasis, some are LXR target genes and their expression could be restored by synthetic LXR agonist treatment. The consequences of LXR activation were assessed here in vitro with analysis of cell proliferation and survival as well as in vivo using mouse model of BPDCN cell xenograft. For in vitro studies, we used freshly isolated primary BPDCN samples, primary BPDCN cells derived from a BPDCN patient samples and a BPDCN cell line derived from a patient and expanded in immunodeficient mice (referred thereafter BES1) and two established BPDCN cell lines (CAL-1 and GEN2.2). Two LXR agonists were used: T0901317 and GW3965 at different concentrations (1 µM - 50 µM), GW3965 being considered as a pure LXRαβ agonist.

Results

A BPDCN-specific transcriptomic signature with a downregulation of genes involved in cholesterol homeostasis allows the clustering of BPDCN samples.

Twelve primary BPDCN samples were analyzed by the Affymetrix mRNA microarray for the expression of cholesterol homeostasis-related genes (LXRA, LXRB, ABCA1, ABCG1, APOE, SREBF1, FASN, LDLR, and VLDLR) plus the NFKB1 gene. These samples were compared with other leukemia samples. While AML and T-ALL sample profiles were spread, BPDCN samples clustered. The BPDCN transcriptomic profile showed a significant downregulation of two LXR target genes encoding proteins involved in cholesterol efflux, ABCAI and ABCGI (ABCA1 and ABCG1 respectively), as well as a downregulation of another LXR target gene SREBF1, and an upregulation of the VLDLR gene. Moreover, we confirmed the previously identified NFKB1 gene upregulation in BPDCN (Figure 1A and S1) (23). To validate that the difference of transcriptomic profiles was independent of PDC cell lineage and was specific to PDC leukemic counterpart, a similar experiment was performed using 5 mRNA samples of primary PDC. Again, a clustering of BPDCN samples was observed, associated with a significant downregulation of LXR target genes SREBF1, ABCG1 while LXRA, VLDLR and NFKB1 genes were upregulated (Figure 1B and S1). Considering ABCA1 and ABCG1 gene transcription in the two BPDCN cell lines available in our laboratory and primary BPDCN BES1 cells, we confirmed by real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) a significant downregulation of mRNA levels compared to primary PDC samples (Figure 1C).

Overall, these data identified a specific perturbation of cholesterol homeostasis-related gene transcription in BPDCN.

LXR activation restores cholesterol homeostasis-related gene expression and induces cholesterol efflux from BPDCN.

LXR activation induces cholesterol efflux through ABCA1 and ABCG1 in cooperation with cholesterol acceptors, such as APOA1 and HDL2 (12, 18). Then, we investigated the involvement of this mechanism in BPDCN cells using two synthetic LXR agonists, T0901317 and GW3965. First, we determined the effect of LXR agonist treatment at lowest concentration (1 µM) on ABCA1 and ABCG1 gene transcription in BPDCN cells. As shown in Figure 2A, LXR agonist treatment increased significantly the mRNA transcription levels of ABCA1 and ABCG1 genes in the 2 cell lines (CAL-1, GEN2.2), as well as in primary BPDCN samples from 4 different patients. ABCA1 protein induction was confirmed on CAL-1 cells by Western blot analysis (Figure 2B), as well as on one primary BPDCN sample and on CAL-1 and GEN2.2 cells by confocal microscopy (Figure 2C). To attest that LXR-induced ABC transporters induce a cholesterol efflux from BPDCN cells, CAL-1 cells were pre-loaded with 3H-cholesterol for 24 hours and treated with either T0901317 or GW3965 for 24 additional hours. To investigate cholesterol efflux, we added to culture media lipid acceptors, APOA1 or HDL2 for 4 hours. This enabled us to assess ABCA1- and ABCG1-mediated efflux, respectively (Figure 2D). Radioactivity was then measured by scintillation counting in media and cell lysates. As shown in Figure 2E, LXR agonist treatment induced a significant increase of cholesterol efflux in both conditions, but more intense in the presence of APOA1. Using the free cholesterol marker filipin, we confirmed by confocal microscopy a diminution of cholesterol content –representative of a cholesterol efflux stimulation– in the two BPDCN cells lines (CAL-1 and GEN2.2), after LXR agonist treatment for 24 hours, followed by APOA1 treatment for 4 hours (Figure 2F). Overall, LXR agonist treatment of BPDCN restores cholesterol homeostasis-related gene expression and stimulates cholesterol efflux via ABCA1 and ABCG1.

LXR activation inhibits BPDCN cell proliferation and induces BPDCN apoptotic cell death.

Since LXR activation can regulate cell proliferation and survival (14, 24), we investigated the effects of LXR stimulation on BPDCN cells. Cell proliferation was assessed only on the proliferating BPDCN cell line, CAL-1. Cells were treated with increasing concentrations (1 µM, 5 µM, 10 µM) of LXR agonists for 24, 48 or 72 hours. These concentrations are not cytotoxic without any significant increase of AnxV+ CAL-1. Proliferation was assessed using cytometry on non-apoptotic cells

(AnxV-/7AAD-) by fluorescent marker dilution. As shown in Figure 3A, LXR agonist treatment for 72 hours induced a sustained decrease of cell proliferation, significant for 10 µM of T0901317 and GW3965 ($p<0.001$). Cell cycle phase analysis demonstrated that LXR agonists induced a G1 phase retention and, in a slight manner, a G2 phase retention, while the proportion of cells in S phase was decreased in a concentration- (5 µM and 10 µM) and time- (24 or 72 hours) dependent manner (Figure 3B). These effects were statistically significant for 10 µM of treatment, for 72 h ($p<0.05$ and 0.01).

Then, we evaluated cell viability of the 2 established BPDCN cell lines (CAL-1, GEN2.2), the primary BPDCN cells BES1 and 3 primary BPDCN samples isolated from 3 different patients exposed for 24 hours to increasing concentrations of LXR agonists T0901317 or GW3965 (10, 30 or 50 µM). This was assessed by different readouts: AnxV/7AAD staining analyzed by cytometry, caspase cleavage analyzed by Western blot and cytometry, as well as nucleus fragmentation after DAPI staining by confocal microscopy. As shown in Figure 4A, LXR agonist treatment induced a significant concentration-dependent cell death of CAL-1 cells for the concentrations higher than 10µM. LXR agonist (50 µM) treatment increased AnxV/7AAD staining of the other BPDCN cell line GEN2.2, BPDCN cells BES1 and of two different primary BPDCN samples (Figure 4A-B). Assessment of PDC marker CD123/BDCA4 expression on the surviving cell population (AnxV–/7AAD–) after LXR agonist treatment of a blood sample from a BPDCN patient revealed a preferential decrease of BPDCN cell percentage (77% BPDCN cells vs. 30% and 42%, for vehicle- vs. GW3965- and T0901317-treated samples, respectively) (Figure 4B). This suggests a specific cytotoxic effect of LXR agonists on BPDCN cells. We investigated death mechanisms using CAL-1 cells treated with the same increasing concentrations of LXR agonists for 1, 6 or 24 hours. Caspase activation was determined by Western blot analysis. As shown in Figure 4C, LXR agonist treatment for 6 hours induced caspase-3 and caspase-9 activation. Caspase-9 cleavage suggests an intrinsic apoptotic pathway. Apoptosis triggering was confirmed in CAL-1 and GEN2.2 cells by nucleus fragmentation induced by 50 µM of GW3965 or T0901317 treatment for 6 hours, as observed by confocal microscopy (Figure S2A). Intrinsic apoptotic pathway involvement was supported by pro-apoptotic BAX and BAK1 gene upregulation in CAL-1, GEN2.2 cells and two primary BPDCN samples after LXR activation (Figure S2B). Finally, to confirm apoptotic cell death after LXR activation, GEN2.2 or primary BPDCN cells isolated from a patient were treated with 50 µM of T0901317 or GW3965 for 6 hours, and a sustained caspase-3 and -9 activation induced by LXR

agonists was confirmed by cytometry analysis (Figure 4D). Overall, these data indicate that LXR agonist treatment induces a significant apoptotic cell death of BPDCN.

LXR activation interferes with two BPDCN survival pathways: the IL-3-induced signaling pathways and NF-κB activation.

Since LXR activation inhibits both BPDCN proliferation (at least in the CAL-1 cell line) and survival of BPDCN cell lines and primary samples, we wondered whether LXR stimulation would interfere with the signaling pathways triggered by the BPDCN growth/survival factor, IL-3. Interaction of IL-3 with its receptor was shown to trigger STAT5 and Akt phosphorylation in different cell types.(25, 26) These two signaling pathways were identified in the survival and proliferation of other leukemic cells (27, 28). We observed that LXR agonist treatment at non-cytotoxic concentrations did not modulate the expression of IL-3R chains, CD123 and CD131 (α and β chain, respectively) on CAL-1 and GEN2.2 cells, as assessed by flow cytometry (Figure 5A). However, pre-treatment of CAL-1 cells with increasing non-cytotoxic concentrations (1 – 10 μM) of LXR agonists significantly diminished IL-3-induced STAT5 and Akt phosphorylation, as assessed by Western blot (Figure 5B). These effects were confirmed by confocal microscopy in the two BPDCN cell lines, CAL-1 and GEN2.2, treated with both LXR agonists (Figure 5C). Overall, these data demonstrated that LXR activation in BPDCN cells inhibits STAT5 and Akt phosphorylation induced by the BPDCN growth/survival factor IL-3.

We reported that BPDCN samples upregulated the NFKB1 gene transcription compared to other acute leukemia samples and normal PDC cells (Figure 1A-B). Since LXR stimulation can repress NF-κB activation (22, 29), we investigated this effect and its involvement in BPDCN cell death. We first investigated the effect of NF-κB inhibition on BPDCN cell death. CAL-1 cells were treated with increasing concentration of the NF- κB inhibitor, JSH-23. We observed a significant increase of BPDCN cell death, assessed with AnxV/7AAD staining and analyzed by flow cytometry (Figure 6A). Then, we assessed the effect of LXR agonist on NF-κB subunit coding gene (NFKB1 and P65) transcription by qRT-PCR analysis. For this, CAL-1, GEN2.2, BES1 cells or primary BPDCN samples from 4 different BPDCN patients were treated with 1 μM of LXR agonists (T0901317 or GW3965) for 24 hours. We observed a decrease of NFKB1 mRNA levels in all LXR agonist-treated BPDCN (significant for GEN2.2 and the 4 primary BPDCN samples, $p<0.05$), while P65 transcription was not modulated (Figure 6B). Confocal microscopy analysis demonstrated that LXR agonist treatment markedly decreased the p65 NF-κB subunit phosphorylation in CAL-1 and GEN2.2

cell lines (Figure 6C) , suggesting another regulatory mechanism. Western blot analysis of CAL-1 cells pretreated with LXR agonists (T0901317 or GW3965, 1 μM) followed by a NF-κB activator (the TLR7 ligand, R848), demonstrated an inhibition of p50, p65 and c-Rel NF-κB subunit nuclear translocation (Figure 6D). Overall, these data demonstrated that LXR stimulation in BPDCN cells inhibits NF-κB activation at different levels: transcription, phosphorylation and nuclear translocation. This may contribute to the cytotoxic effects of LXR agonist treatment on BPDCN, since BPDCN cells were sensitive to NF-κB inhibitor-induced death.

Cholesterol efflux stimulation amplifies LXR activation-induced effects.

Cholesterol efflux (involving ABCA1/ABCG1) was shown to interfere with IL-3-induced hematopoietic progenitor proliferation (13, 14). We reported above that LXR activation in BPDCN interfered with the IL-3 signaling pathway. To investigate the contribution of LXR-increased cholesterol efflux in these effects, CAL-1 and GEN2.2 cells were treated with LXR agonists at the lowest concentration (1 μM) for 24 hours. Then, cells were treated for 4 additional hours with APOA1 (10 μg/mL) followed by 30 minutes with IL-3 (10 ng/mL). As observed in Figure 7A, addition of APOA1 on LXR-treated BPDCN cells markedly diminished STAT5 and Akt phosphorylation. To confirm the involvement of cholesterol efflux in BPDCN cell death, CAL-1 cells were exposed to increasing non cytotoxic concentrations (5 - 10 μM) of T0901317 or GW3965 with increasing concentrations of the cholesterol acceptor APOA1, to promote cholesterol efflux. APOA1 increased significantly the cytotoxic effect of LXR agonists, while APOA1 alone had no effect (Figure 7B). Overall, these data demonstrated that the stimulation of cholesterol efflux potentiates LXR agonist-induced BPDCN cell death.

In vivo LXR agonist treatment prevents cytopenia and BPDCN spleen and bone marrow infiltration.

To assess LXR agonist treatment efficiency in vivo, sub-lethally irradiated (2 Gy) NSG mice were grafted with 1 million of CAL-1 cells, or not. After 7 days, mice were treated with two doses of LXR agonist (T0901317 30 mg/kg or 60 mg/kg) or with vehicle, every 2 days until sacrifice. As shown in Figure 8A, irradiation followed by CAL-1 cell injection induced a significant persistent decrease of red blood cell (RBC) and platelet (PLT) counts, as well as hemoglobin (HGB) concentration, while cytopenia is only transient in irradiated control mice. In contrast to untreated mice, T0901317-treated mice receiving CAL-1 cells showed a significant prevention of cytopenia, observed for RBC counts and HGB concentration (Figure 8A). Moreover, at sacrifice, a diminution of CAL-1 cell-induced

splenomegaly was observed (Figure 8B). This data was supported by a potent decrease of spleen and bone marrow BPDCN cell infiltration, as assessed by flow cytometry (Figure 8C). Overall, these data provide the in vitro and in vivo demonstration of a therapeutic effect of LXR agonist on BPDCN through, at least, 3 different mechanisms including signaling pathway regulation and cholesterol efflux.

Discussion

Cholesterol homeostasis is tightly controlled by the LXR signaling pathway under physiological conditions, and cholesterol is a critical component of plasma membrane supporting cell growth and proliferation. This is well illustrated by the inhibition of hematopoietic stem cell proliferation occurring after cholesterol efflux through ABC transporters and the lipid acceptor APOE (13, 14). Here, we wondered whether BPDCN, an aggressive hematological malignancy, would exhibit a dysregulated cholesterol homeostasis that could be restored by LXR agonist treatment. Indeed, we identified a BPDCN-specific gene signature with a downregulation of several LXR target genes and a perturbation of genes involved in cholesterol homeostasis. This BPDCN-specific transcriptomic profile may lead to cholesterol accumulation within leukemic cells then responsible for high proliferative/self-renewal properties. Upon activation with LXR agonists, LXR target gene expression in BPDCN was increased and this treatment stimulated cholesterol efflux associated with the inhibition of cell proliferation and survival. These two effects may be related to, at least, 3 mechanisms triggered by LXR activation in BPDCN, namely: an enhanced cholesterol efflux reinforced by the addition of lipid acceptor APOA1, interference with the IL-3 signaling pathway, and NF-κB inhibition. All these effects, excepted cell proliferation, were assessed in vitro in two BPDCN cell lines, BDPCN cells after theirexpansion in immunodeficient mice and primary BPDCN isolated form 7 different patients. A therapeutic effect of LXR agonist treatment was observed in vivo in a xenograft model with inhibition of BPDCN cell infiltration and prevention of BPDCN-induced cytopenia. These data highlight an unraveled perturbation of cholesterol homeostasis and LXR activity in BPDCN. They also identify a new approach based on LXR agonists to treat this aggressive hematological malignancy.

BPDCN exhibit a specific downregulation of LXR target genes ABCG1, ABCA1 and SREBF1, suggesting a downregulation of LXR transcriptomic activity compared to AML and T-ALL, as well as to their normal PDC counterpart. However, genes encoding the two isoforms of LXR (LXRA and LXRB) showed similar expression levels when compared with other acute leukemia samples. LXRA

transcripts were shown to be over-expressed in AML, probably in accordance with its myeloid origin (30, 31). Yet, LXRA mRNA levels in BPDCN were upregulated in comparison with levels found in normal PDC, while the ubiquitous LXRβ isoform is mainly expressed at protein levels in the BPDCN cell line CAL-1. This decrease of LXR target gene transcripts without any diminution of LXR gene expression suggests that repression of LXR activity in BPDCN is not at the transcriptional level but could result from a post-transcriptional regulation (18). While the precise mechanism remains to be determined, one hypothesis for this decreased expression of LXR target genes is the constitutive activation of NF-κB in BPDCN. This constitutive activation associated with transcription upregulation of the NF-κB precursor NFKB1 (encoding p105, the precursor form of the p50 subunit (32)) had already been reported in BPDCN (23). We reported recently that NF-κB activation in normal PDC before LXR activation reduced the transcription of LXR target genes, ABCA1 and SREBF1(22). This gene profile justifies the use of synthetic LXR agonists to restore LXR activities in BPDCN as an anti-leukemic treatment.

LXR activation in BPDCN has several effects depending on the different concentrations of LXR agonists. Restoration of LXR target gene expression and membrane ABCA1 expression as well as stimulation of cholesterol efflux require lowest concentrations (1 μM), as reported for other murine and human LXR-expressing cells (18, 34, 35). LXR agonists at concentrations between 5 - 10 μM (ranges usually used in malignant cells, see (24, 36–38)) inhibit significantly the IL-3 signaling pathway, NF-κB activation and BPDCN cell proliferation. LXR activation through agonist treatment was reported in several hematological malignancies and solid tumors to inhibit cell proliferation (24, 36, 37, 39, 40). Proliferation was assessed in our study only with the highly proliferative CAL-1 BPDCN cell line, since GEN2.2 cell line needs murine adherent feeder cells to be amplified (40) and freshly isolated primary BPDCN cells from patient samples do not proliferate and survive in culture 36-48 hours after isolation. BPDCN cell death was achieved for LXR agonist concentrations higher than 10 μM, as reported for breast and colon cancer cells (41). We observed a significant cytotoxic effect of LXR agonists on normal PDC at a concentration of 10 μM. This suggests that as frequently reported for malignant cells, BPDCN are more resistant than their normal counterpart to cell death. We identified an apoptotic cell death mechanism based on different features, namely: exposure of phosphatidylserine at the external leaflet of plasma membrane, cleavage of the intrinsic pathway caspase-9 and the executioner caspase-3, as well as nucleus fragmentation. This was observed for the different BPDCN cell lines, as well as 3 different primary BPDCN samples (at points appropriate to spontaneous apoptosis, i.e., less than 24 hours). Induction of the intrinsic apoptotic pathway by LXR

agonist T0901317 was previously described in ovarian carcinoma cells (42). A significant increase of BAX and BAK1 transcripts (encoding the pro-apoptotic proteins, BAX and BAK1) were detected in LXR-treated BPDCN, supporting the implication of intrinsic apoptotic pathway after LXR activation. LXR-induced cell death in breast cancer cells demonstrated to implicate BAX upregulation and be dependent on cholesterol efflux through ABCG1 (42). We report here that addition of lipid acceptor APOA1 responsible for cholesterol efflux via ABCA1 leads to decrease LXR agonist concentrations required to induce cell death from 30 - 50 µM to 5 µM and 10 µM for GW3965 and T0901317, respectively. A synergistic effect of APOA1-stimulated cholesterol efflux on LXR activation is also observed for inhibition of Akt and STAT5 phosphorylation. Overall, LXR stimulation in BPDCN exerts an anti-leukemic effect that can be enhanced by increasing cholesterol efflux. This confirms the potent cytotoxic effect of cholesterol starvation.

Our study confirms constitutive NF-κB activation in BPDCN cells (23). NF-κB was shown to promote G1 to S cell cycle phase transition through cyclin D1 regulation (43), thus increasing cell proliferation. We reported here an inhibition of CAL-1 BPDCN cell proliferation induced by both LXR agonists. This was associated with G1 cell cycle phase arrest. LXR activation in BPDCN inhibits NF-κB signaling pathway at three different levels: transcription of the NF-κB precursor NFKB1, p65 phosphorylation and nuclear translocation of the p50, p65 and cRel subunits. Inhibition of p65 translocation by the JSH-23 inhibitor is sufficient to induce BPDCN cell death. Thus, inhibition of NF-κB in BPDCN may be involved in the anti-proliferative and cytotoxic effects of LXR agonists.

IL-3 is a survival factor for BPDCN (1, 15)and these leukemic cells are characterized by a high expression of CD123 (44). Therapeutic strategies to treat BPDCN propose to interfere with this pathway (25, 45, 46). Here, we explore how LXR activation and LXR-induced cholesterol efflux interact with this pathway. Increased membrane cholesterol content in hematopoietic stem cells secondary to ABC transporter deficiency results in increased cell surface expression of CD131, explaining the increased proliferative response of these cells to IL-3 (14). We did not observe any modification of CD131 and CD123 expression on BPDCN after LXR activation. However, IL-3-induced Akt and STAT5 phosphorylation in BPDCN was inhibited by LXR stimulation. Preliminary data show that STAT5A or STAT5B gene transcription is not repressed by LXR agonist treatment in the 2 BPDCN cell lines and one primary BPDCN cells tested. These suggest that LXR signaling acts predominantly at the phosphorylation step. STAT5 was reported to increase cell proliferation through cyclin D1 induction and subsequent G1 to S phase transition (47) and we demonstrated that LXR

activation in BPDCN inhibits both IL-3-induced STAT5 activation and progression in G1 phase of the cell cycle. The addition of the cholesterol acceptor APOA1 (promoting cholesterol efflux) enhanced the inhibition of STAT5 and Akt phosphorylation. This is in line with a previous report in prostate cancer cells showing Akt inhibition by increased cholesterol efflux (37).

LXR agonist treatment of mice grafted with BPDCN cells prevents leukemia-induced cytopenia and reduces BPDCN spleen and bone marrow infiltrations. To date, the development of LXR agonists in the clinical settings has been hampered by unwanted systemic side effects, such as fatty liver disease and LDL elevation (17). Efforts are currently performed to generate new synthetic agonists with increased specificity for the LXRβ isoform –expressed by BPDCN– to limit steatosis (18, 48), and/or to stimulate LXR specifically in a target tissue (49, 50). Our study supports a new approach for BPDCN treatment using these new synthetic LXR agonists.

Materials and Methods

Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm collection

Nineteen BPDCN samples were collected at diagnosis before any treatment. Informed consent was obtained from each patient. Primary BPDCN cells were obtained from our national network that collects data and cells (authorization number #DC-2008-713) from patients diagnosed in France since 2004. This study was approved by the local ethics committee (CPP Est II, Besançon, France). BPDCN was diagnosed based on histopathology and immunostaining of cutaneous lesions, blood or bone marrow samples according to the following reference (51). Data at diagnosis have been already reported (44, 52).

Cell lines and culture

Two established (CAL-1 and GEN2.2) (40, 53), BPDCN cells (called BES1) isolated in our laboratory from a patient diagnosed with BPDCN and expanded in NOD-SCID IL2Rγc-deficient (NSG) mice (The Jackson laboratory, Sacramento, CA, USA) for 100 days and 7 BPDCN samples from newly diagnosed patients were used for in vitro assays. Cells were cultured in RPMI 1640 glutamax medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (Invitrogen), 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies, Gaithersburg, MD) with two LXR agonists (T0901317 and GW3965, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma-Aldrich).

Transcriptomic analysis

Samples from 12 patients suffering from BPDCN, 65 AML samples (including different French-American-British [FAB] subtypes: 25 M0, 11 M1, 10 M2, 1 M3, 11 M4, 6 M5 and 1 M6), (U837, IRCL, Lille, France), 35 T ALL samples (U1151, Laboratoire d'Onco-Hématologie, AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France) and 5 primary PDC (Available on GEO database, under recording numbers: GSM705329, GSM705330, GSM705331, GSM705332, GSM705333) were submitted to transcriptomic analysis using the GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA). Data were analyzed using DChip software (http://www.hsph.harvard.edu/cli/complab/dchip/). Analysis was based on the expression of LXR genes (LXRA, LXRB), genes coding proteins involved in cholesterol efflux (ABCA1, ABCG1, APOE), cholesterol uptake (LDLR, VLDLR), lipogenesis (SREBF1, FASN) plus the NFKB1 gene that can be trans-repressed by LxR (29). Some of these genes are LXR target genes (ABCA1, ABCG1, APOE, FASN, LXRA, and SREBF1).

Quantitative Reverse Transcription PCR analysis

Quantitative RT-PCR analysis was used to measure the expression of LXR target genes (ABCA1, ABCG1) and genes coding proteins involved in intrinsic apoptotic pathway (BCL2, BAK1, BAX). Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Reverse-transcription into cDNA was performed using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France). Then, cDNA were quantified by real time RT-PCR using either the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) or the Taqman Universal Buffer II (Applied Biosystems) on a CFX96 Real-Time device (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Relative mRNA levels were determined using the ΔΔCt method. Values were expressed according to GAPDH levels. The sequences of the oligonucleotides used are described in supplemental table 1.

Cholesterol efflux assay

CAL-1 cells were loaded with 50 mg/ml acetylated LDL and 1 mCi/ml [3H]-cholesterol (PerkinElmer Life Science, Waltham, MA, USA) in RPMI 1640 medium supplemented with 0.2% BSA (Sigma–Aldrich). After 24 h, the labeling medium was removed and cells were washed three times with RPMI1640 medium containing 0.2% BSA, and then treated with LXR agonists (GW3965 and T0901317) at a final concentration of 1 μM during 24 additional hours. Cholesterol efflux in the medium was assessed in the presence of 20 mg protein/ml HDL2 (density = 1.063–1.125 g/ml,

isolated from normolipidemic human plasma by sequential density ultracentrifugation) or APOA1 (Sigma-Aldrich), as cholesterol acceptors, or with no acceptor for 4 h. Radioactivity in the media and total cell-associated radioactivity were determined by scintillation counting. The assays were performed in triplicate (APOA1) or quadruplicate (HDL2). The percentage of cholesterol efflux was calculated as follows: [3H]-cholesterol in medium/([3H]-cholesterol in medium + [3H]-cholesterol in cells) x 100 and by subtracting cholesterol efflux of the wells under vehicle/DMSO conditions without exogenous acceptors.(54) Data were confirmed in CAL-1, GEN2.2 cells and primary BPDCN samples using Filipin (Sigma-Aldrich), a fluorescent probe to assess cellular cholesterol content by confocal microscopy according to manufacturer's instructions.

Analysis of cell death, cell proliferation and cell cycle by flow cytometry

Cytotoxic effects of LXR agonists on BPDCN cell lines or primary BPDCN cells were evaluated by flow cytometry using Annexin-V and 7-amino actinomycin D (FITC-conjugated AnxV, 7AAD, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) staining, or caspase -9 activation staining (CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase Staining Kit, eBioscience) according to manufacturer's instructions. Moreover, caspase 3 and caspase 9 cleavage in CAL-1 cells were evaluated by immunoblotting (as described below). Nucleus fragmentation was evaluated by DAPI staining, and analyzed by confocal microscopy.

Proliferation was assessed by prior staining of BPDCN cells using Cell proliferation dye eFluor® 450 (eBioscience SA, Paris, France) followed by cytometry analysis. Antibodies against the following receptors were used: CD123, CD131, CD304 (supplemental table 2) for IL-3 receptor expression or BPDCN gating by cytometry. Flow cytometry was performed using a CANTO II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and DIVA 6.2 software (BD Biosciences). Cell cycle analysis was performed after Propidium Iodide (PI) staining using a FC500 cytometer and CXP™ software for acquisition, and WinCycle software for analyses (Beckman Coulter Immunotech, Miami, FL, USA). Briefly, cells were fixed with ethanol 70% for overnight incubation at 4°C, washed then stained with PI solution containing RNAse by overnight incubation at 4°C before analysis.

Analysis of protein expression and cellular signaling events by immunoblotting

Immunobloting was used to assess in the BPDCN line CAL-1, caspase activation, LXRα/β and ABCA1 protein expression, NF-κB activation, STAT5 and Akt phosphorylation after LXR agonist treatment followed by R848 (1 μg/mL for 45 minutes) or IL-3 (10 ng/mL for 30 minutes) for NF-κB

and STAT5/Akt staining respectively. Protein lysates were separated by Sodium Dodecyl Sulfate gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transfered to PVDF membranes (Biorad). After incubation for 1.5 h at room temperature with 5% nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS) 0.1% Tween 20 buffer solution, membranes were incubated overnight with the primary antibody (supplemental table 2) diluted in 1% nonfat milk in TBS-0.1% Tween 20 solution, washed, incubated with the secondary antibody (supplemental table 2) for an additional 1.5 h at room temperature, and washed again before revealed with the Clarity Western ECL reagent (Biorad) and analyzed using a camera CCD (Vilber-Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Plot intensity analysis was performed with ImageJ application (http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html).

Analysis of protein expression and cellular signaling events by confocal microscopy

CAL-1, GEN2.2 or primary BPDCN cells were incubated with LXR agonist (1 μM) for 24 h. Then, cells were evaluated for expression of membrane molecules (CD123 and ABCA1), intracellular signaling pathway components (phospho-p65, phospho-STAT5, phospho-Akt), cholesterol component (Filipin) and nucleus (DAPI), by confocal microscopy as previously described.(22) The description of material used appears in supplemental table 2.

Mice and in vivo model

NOD-SCID IL2Rγc-deficient (NSG) mice (The Jackson laboratory, Sacramento, CA, USA) –bred in our specific pathogen-free rodent facility (Agreement #D25-056-7)– were irradiated (2 Gy) and inoculated intravenously 18 h later with 1x106 CAL-1 cells and treated intra-peritoneally 7 days later with a total of 6 injections (repeated thrice each two days) of LXR agonist T091317 (0.6 or 1.2 mg/mouse/injection, total experimental dose 30 or 60 mg/kg respectively) or with DMSO/phosphate-buffered saline (PBS) 50% only. Blood parameters including: hemoglobin (g/dL), red blood cells (x109/L) and platelets (x109/L) (XN 10, Sysmex, Norderstedt Germany). As blood parameter controls, we used irradiated mice that did not receive CAL-1 and were no treated (n=5). Mice were examined daily for the overall activity and for the presence of tumoral syndrome, and sacrificed whenever appropriate. These procedures were carried out in accordance with the guidelines for animal experimentation according to an approved protocol (protocol 11007R, Veterinary Services for Animal Health & Protection, issued by the Ministry for Agriculture, Paris, France). Quantification of spleen and bone marrow infiltrated leukemic cells at sacrifice was determined by flow cytometry using mouse CD45/human CD45/CD123/BDCA4 mAb (supplemental table 2) staining.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statel software 2.6 (Adscience, Paris, France). Data are expressed as mean ± S.E.M. and Mann-Whitney or Wilcoxon test was used to determine their significance.

Supplementary Materials

Supplementary materials and methods:

Supplemental table 1. Primers used for quantitative RT-PCR analysis.

Supplemental table 2. Antibodies used for cytometry, immunoblotting and confocal microscopy

Supplementary figures

Fig. S1. A BPDCN-specific transcriptomic profile shows a basal cholesterol homeostasis-related gene downregulation compared with the transcriptomic profile of AML, T-ALL and primary PDC.

Fig. S2. LXR activation in BPDCN induces apoptotic cell death.

Fig. S3. Constitutive NF-κB activation and IL-3 stimulation repress LXR target genes in BPDCN cells.

References and Notes:

1. L. Chaperot, N. Bendriss, O. Manches, R. Gressin, M. Maynadie, F. Trimoreau, H. Orfeuvre, B. Corront, J. Feuillard, J.-J. Sotto, J.-C. Bensa, F. Brière, J. Plumas, M.-C. Jacob, Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells, Blood 97, 3210–3217 (2001).

2. S. Dalle, M. Beylot-Barry, M. Bagot, D. Lipsker, L. Machet, P. Joly, A. Dompmartin, M. d'Incan, E. Maubec, F. Grange, O. Dereure, S. Prey, S. Barete, M. Wetterwald, S. Fraitag, T. Petrella, Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: is transplantation the treatment of choice?, Br. J. Dermatol. 162, 74–79 (2010).

3. L. Gilis, L. Lebras, F. Bouafia-Sauvy, D. Espinouse, P. Felman, F. Berger, G. Salles, B. Coiffier, A.-S. Michallet, Sequential combination of high dose methotrexate and L-asparaginase followed by allogeneic transplant: a first-line strategy for CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm, Leuk. Lymphoma 53, 1633–1637 (2012).

4. A. Pileri, C. Delfino, V. Grandi, C. Agostinelli, S. A. Pileri, N. Pimpinelli, Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN): the cutaneous sanctuary, G. Ital. Dermatol. E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. E Sifilogr. 147, 603–608 (2012).

5. M. D. Minden, J. Dimitroulakos, D. Nohynek, L. Z. Penn, Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acute myeloblastic leukemia, Leuk. Lymphoma 40, 659–662 (2001).

6. S. Kawata, E. Yamasaki, T. Nagase, Y. Inui, N. Ito, Y. Matsuda, M. Inada, S. Tamura, S. Noda, Y. Imai, Y. Matsuzawa, Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial, Br. J. Cancer 84, 886–891 (2001).

7. J. Wu, W. W.-L. Wong, F. Khosravi, M. D. Minden, L. Z. Penn, Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis, Cancer Res. 64, 6461–6468 (2004).

8. J. Dimitroulakos, D. Nohynek, K. L. Backway, D. W. Hedley, H. Yeger, M. H. Freedman, M. D. Minden, L. Z. Penn, Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach, Blood 93, 1308–1318 (1999).

9. A. Thibault, D. Samid, A. C. Tompkins, W. D. Figg, M. R. Cooper, R. J. Hohl, J. Trepel, B. Liang, N. Patronas, D. J. Venzon, E. Reed, C. E. Myers, Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 2, 483–491 (1996).

10. S. Vitols, S. Norgren, G. Juliusson, L. Tatidis, H. Luthman, Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells, Blood 84, 2689–2698 (1994).

11. L. Tatidis, A. Gruber, S. Vitols, Decreased feedback regulation of low density lipoprotein receptor activity by sterols in leukemic cells from patients with acute myelogenous leukemia, J. Lipid Res. 38, 2436–2445 (1997).

12. J. F. Oram, A. M. Vaughan, ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease, Circ. Res. 99, 1031–1043 (2006).

13. A. J. Murphy, M. Akhtari, S. Tolani, T. Pagler, N. Bijl, C.-L. Kuo, M. Wang, M. Sanson, S. Abramowicz, C. Welch, A. E. Bochem, J. A. Kuivenhoven, L. Yvan-Charvet, A. R. Tall, ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice, J. Clin. Invest. 121, 4138–4149 (2011).

14. L. Yvan-Charvet, T. Pagler, E. L. Gautier, S. Avagyan, R. L. Siry, S. Han, C. L. Welch, N. Wang, G. J. Randolph, H. W. Snoeck, A. R. Tall, ATP-Binding Cassette Transporters and HDL Suppress Hematopoietic Stem Cell Proliferation, Science 328, 1689–1693 (2010).

15. F. Garnache-Ottou, Expression of the myeloid-associated marker CD33 is not an exclusive factor for leukemic plasmacytoid dendritic cells, Blood 105, 1256–1264 (2004).

16. S.-S. Im, T. F. Osborne, Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation, Circ. Res. 108, 996–1001 (2011).

17. C. Hong, P. Tontonoz, Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery, Nat. Rev. Drug Discov. 13, 433–444 (2014).

18. G. Wójcicka, A. Jamroz-Wiśniewska, K. Horoszewicz, J. Bełtowski, Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism, Postępy Hig. Med. Dośw. Online 61, 736–759 (2007).

19. D. E. Dove, M. F. Linton, S. Fazio, ApoE-mediated cholesterol efflux from macrophages: separation of autocrine and paracrine effects, Am. J. Physiol. - Cell Physiol. 288, C586–C592 (2005).

20. C. Hong, S. Duit, P. Jalonen, R. Out, L. Scheer, V. Sorrentino, R. Boyadjian, K. W. Rodenburg, E. Foley, L. Korhonen, D. Lindholm, J. Nimpf, T. J. C. van Berkel, P. Tontonoz, N. Zelcer, The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2, J. Biol. Chem. 285, 19720–19726 (2010).

21. L. Zhang, K. Reue, L. G. Fong, S. G. Young, P. Tontonoz, Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 32, 2541–2546 (2012).

22. A. Ceroi, F. Angelot Delettre, C. Marotel, T. Gauthier, A. Asgarova, S. Biichlé, A. Duperrier, G. Mourey, S. Perruche, L. Lagrost, D. Masson, P. Saas, The Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Derived Microparticles in Human Plasmacytoid Dendritic Cells Involve Liver X Receptor Activation, Haematologica (2015), doi:10.3324/haematol.2015.135459.

23. M. R. Sapienza, F. Fuligni, C. Agostinelli, C. Tripodo, S. Righi, M. A. Laginestra, A. Pileri, M. Mancini, M. Rossi, F. Ricci, A. Gazzola, F. Melle, C. Mannu, F. Ulbar, M. Arpinati, M. Paulli, T.

Maeda, D. Gibellini, L. Pagano, N. Pimpinelli, M. Santucci, L. Cerroni, C. M. Croce, F. Facchetti, P. P. Piccaluga, S. A. Pileri, AIRC 5xMille consortium 'Genetics-driven targeted management of lymphoid malignancies and the Italian Registry on Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm, Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF-kB pathway inhibition, Leukemia 28, 1606–1616 (2014).

24. C.-Y. Lin, J.-Å. Gustafsson, Targeting liver X receptors in cancer therapeutics, Nat. Rev. Cancer 15, 216–224 (2015).

25. U. Testa, E. Pelosi, A. Frankel, CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies, Biomark. Res. 2, 4 (2014).

26. E. P. Reddy, A. Korapati, P. Chaturvedi, S. Rane, IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled, Oncogene 19, 2532–2547 (2000).

27. L. Schafranek, E. Nievergall, J. A. Powell, D. K. Hiwase, T. Leclercq, T. P. Hughes, D. L. White, Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia, Leukemia 29, 76–85 (2015).

28. J. Zhuang, S. F. Hawkins, M. A. Glenn, K. Lin, G. G. Johnson, A. Carter, J. C. Cawley, A. R. Pettitt, Akt is activated in chronic lymphocytic leukemia cells and delivers a pro-survival signal: the therapeutic potential of Akt inhibition, Haematologica 95, 110–118 (2010).

29. M. Canavan, C. McCarthy, N. B. Larbi, J. Dowling, L. Collins, F. O'Sullivan, G. Hurley, C. Murphy, A. Quinlan, G. Moloney, T. Darby, J. Macsharry, H. Kagechika, P. Moynagh, S. Melgar, C. E. Loscher, Activation of liver X receptor suppresses the production of the IL-12 family of cytokines by blocking nuclear translocation of NF-κBp50, Innate Immun. (2013), doi:10.1177/1753425913501915.

30. S. D. P. W. M. Peeters, D. M. van der Kolk, G. de Haan, L. Bystrykh, F. Kuipers, E. G. E. de Vries, E. Vellenga, Selective expression of cholesterol metabolism genes in normal CD34+CD38- cells with a heterogeneous expression pattern in AML cells, Exp. Hematol. 34, 622–630 (2006).

31. T. Kohro, T. Nakajima, Y. Wada, A. Sugiyama, M. Ishii, S. Tsutsumi, H. Aburatani, I. Imoto, J. Inazawa, T. Hamakubo, T. Kodama, M. Emi, Genomic structure and mapping of human orphan receptor LXR alpha: upregulation of LXRa mRNA during monocyte to macrophage differentiation, J. Atheroscler. Thromb. 7, 145–151 (2000).

32. M. S. Hayden, S. Ghosh, NF-κB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions, Genes Dev. 26, 203–234 (2012).

33. S. B. Joseph, A. Castrillo, B. A. Laffitte, D. J. Mangelsdorf, P. Tontonoz, Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors, Nat. Med. 9, 213–219 (2003).

34. H. Scholz, T. Lund, M. K. Dahle, J. L. Collins, O. Korsgren, J. E. Wang, A. Foss, The synthetic liver X receptor agonist GW3965 reduces tissue factor production and inflammatory responses in human islets in vitro, Diabetologia 52, 1352–1362 (2009).

35. L.-L. Vedin, S. A. Lewandowski, P. Parini, J.-A. Gustafsson, K. R. Steffensen, The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells, Carcinogenesis 30, 575–579 (2009).

36. L.-L. Vedin, J.-Å. Gustafsson, K. R. Steffensen, The oxysterol receptors LXRα and LXRβ suppress proliferation in the colon, Mol. Carcinog. 52, 835–844 (2013).

37. A. J. C. Pommier, G. Alves, E. Viennois, S. Bernard, Y. Communal, B. Sion, G. Marceau, C. Damon, K. Mouzat, F. Caira, S. Baron, J. M. A. Lobaccaro, Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells, Oncogene 29, 2712–2723 (2010).

38. R. Geyeregger, M. Shehata, M. Zeyda, F. W. Kiefer, K. M. Stuhlmeier, E. Porpaczy, G. J. Zlabinger, U. Jäger, T. M. Stulnig, Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes, J. Leukoc. Biol. 86, 1039–1048 (2009).

39. J. R. Agarwal, Q. Wang, T. Tanno, Z. Rasheed, A. Merchant, N. Ghosh, I. Borrello, C. A. Huff, F. Parhami, W. Matsui, Activation of liver X receptors inhibits hedgehog signaling, clonogenic growth, and self-renewal in multiple myeloma, Mol. Cancer Ther. 13, 1873–1881 (2014).

40. L. Chaperot, A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J.-P. Molens, J. Plumas, Virus or TLR Agonists Induce TRAIL-Mediated Cytotoxic Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells, J. Immunol. 176, 248–255 (2006).

41. A. El Roz, J.-M. Bard, J.-M. Huvelin, H. Nazih, LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis, Anticancer Res. 32, 3007–3013 (2012).

42. J. J. Rough, M. A. Monroy, S. Yerrum, J. M. Daly, Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells, J. Ovarian Res. 3, 13 (2010).

43. M. Hinz, D. Krappmann, A. Eichten, A. Heder, C. Scheidereit, M. Strauss, NF-κB Function in Growth Control: Regulation of Cyclin D1 Expression and G0/G1-to-S-Phase Transition, Mol. Cell. Biol. 19, 2690–2698 (1999).

44. F. Garnache-Ottou, J. Feuillard, C. Ferrand, S. Biichle, F. Trimoreau, E. Seilles, V. Salaun, R. Garand, P. Lepelley, M. Maynadié, E. Kuhlein, E. Deconinck, S. Daliphard, L. Chaperot, L. Beseggio, V. Foisseaud, E. Macintyre, M.-C. Bene, P. Saas, M.-C. Jacob, GOELAMS and GEIL study, Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia, Br. J. Haematol. 145, 624–636 (2009).

45. A. E. Frankel, J. H. Woo, C. Ahn, N. Pemmaraju, B. C. Medeiros, H. E. Carraway, O. Frankfurt, S. J. Forman, X. A. Yang, M. Konopleva, F. Garnache-Ottou, F. Angelot-Delettre, C. Brooks, M.

Szarek, E. Rowinsky, Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients, Blood 124, 385–392 (2014).

46. F. Angelot-Delettre, A. Roggy, A. E. Frankel, B. Lamarthee, E. Seilles, S. Biichle, B. Royer, E. Deconinck, E. K. Rowinsky, C. Brooks, V. Bardet, B. Benet, H. Bennani, Z. Benseddik, A. Debliquis, D. Lusina, M. Roussel, F. Solly, M. Ticchioni, P. Saas, F. Garnache-Ottou, In vivo and in vitro sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent, Haematologica 100, 223–230 (2015).

47. A. Dagvadorj, R. A. Kirken, B. Leiby, J. Karras, M. T. Nevalainen, Transcription factor signal transducer and activator of transcription 5 promotes growth of human prostate cancer cells in vivo, Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. 14, 1317–1324 (2008).

48. T. G. Kirchgessner, R. Martin, P. Sleph, D. Grimm, X. Liu, J. Lupisella, J. Smalley, R. Narayanan, Y. Xie, J. Ostrowski, G. H. Cantor, R. Mohan, E. Kick, Pharmacological characterization of a novel liver X receptor agonist with partial LXRα activity and a favorable window in nonhuman primates, J. Pharmacol. Exp. Ther. 352, 305–314 (2015).

49. B. Hu, R. J. Unwalla, I. Goljer, J. W. Jetter, E. M. Quinet, T. J. Berrodin, M. D. Basso, I. B. Feingold, A. G. Nilsson, A. Wilhelmsson, M. J. Evans, J. E. Wrobel, Identification of phenylsulfone-substituted quinoxaline (WYE-672) as a tissue selective liver X-receptor (LXR) agonist, J. Med. Chem. 53, 3296–3304 (2010).

50. R. K. V. Lim, S. Yu, B. Cheng, S. Li, N.-J. Kim, Y. Cao, V. Chi, J. Y. Kim, A. K. Chatterjee, P. G. Schultz, M. S. Tremblay, S. A. Kazane, Targeted Delivery of LXR Agonist Using a Site-Specific Antibody–Drug Conjugate, Bioconjug. Chem. (2015), doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00203.

51. W. Riaz, L. Zhang, P. Horna, L. Sokol, Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: update on molecular biology, diagnosis, and therapy, Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent. 21, 279–289 (2014).

52. F. Angelot-Delettre, S. Biichle, C. Ferrand, E. Seilles, B. Gaugler, V. Harrivel, M. A. Rosenthal-Allieri, E. Deconinck, P. Saas, F. Garnache-Ottou, Intracytoplasmic detection of TCL1--but not ILT7-by flow cytometry is useful for blastic plasmacytoid dendritic cell leukemia diagnosis, Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol. 81, 718–724 (2012).

53. T. Maeda, K. Murata, T. Fukushima, K. Sugahara, K. Tsuruda, M. Anami, Y. Onimaru, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, R. Moriuchi, H. Hasegawa, Y. Yamada, S. Kamihira, A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma, Int. J. Hematol. 81, 148–154 (2005).

54. M. Ishibashi, R. Filomenko, C. Rébé, A. Chevriaux, A. Varin, V. Derangère, G. Bessède, P. Gambert, L. Lagrost, D. Masson, Knock-down of the oxysterol receptor LXRα impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXRβ activation, Biochem. Pharmacol. 86, 122–129 (2013).

Acknowledgments: Thank others for any contributions. Funding: Include all funding sources here, including grant numbers and funding agencies. Author contributions: Here describe the contributions of each author (use initials) to the paper. Competing interests: Include any financial interests of the authors that could be perceived as being a conflict of interest. Here also include any awarded or filed patents pertaining to the results presented in the paper. Data and materials availability: If data are in an archive, include the accession number or a placeholder for it. Here also include any materials that must be obtained through an MTA. Acknowledgments follow the references and notes but are not numbered.

Supplementary Information

Materials and Methods

Supplemental table 1. Primers used for quantitative RT-PCR analysis.

SYBR Green Assay (Eurofins mwg/operon)	
Target	Sequence (5'->3')
ABCA1 forward	GCACTGAGAGATGCTGAAA
ABCA1 reverse	AGTTCCTGGAAGGTCTTCAC
ABCG1 forward	CAT CTC ACT GTG CAG GA
ABCG1 reverse	GTT GTT CAC CAG CTC CA
GAPDH forward	ACATCATCCCTGCCTCTACTG
GAPDH reverse	ACCACCTGGTGCTCACTGTA
Gene	Assay on demand reference # (Applied Biosystem)
GAPDH	4352934E
BCL2	Hs00608023_m1
BAX	Hs00180269_m1
BAK1	Hs00832876_g1
NFKB1	Hs00765730_m1
P65	Hs00153294_m1
STAT5A	Hs00234181_m1
STAT5B	Hs00273500_m1

Supplemental table 2. Antibodies used for cytometry, immunoblotting and confocal microscopy

Antibody against:	Reference #	Providers
Caspase-3	9662	Cell Signaling
Caspase-9	9502	Cell Signaling
Actine	A5441	Sigma
Lamine B1	Ab16048	Abcam
Anti-Mouse HRP	515-035-062	Jackson Immuno Research
Anti-Goat HRP	805-035-180	Jackson Immuno Research
Phospho-Akt (Ser473)	4060	Cell Signaling
Phospho-STAT5 (Y694)	611964	BD Biosciences
Phospho-NF-kB P65 (S536)	558377	BD Biosciences
Purified anti-CD123	555642	BD Biosciences
Anti-Ig mouse Af488	A11008	Lifetechnologies
Anti-Ig Rabbit AF555	A21422	Lifetechnologies
PE-conjugated anti-human CD304 mAb	130-090-533 AD5-17F6	Miltenyi Biotec
Phycoerythrin-cyanin 7-conjugated anti-human CD123 mAb	306010 (clone 6H6)	Biolegend
PE anti-human CD131 Antibody	306104 (clone 1C1)	Biolegend
Allophycocyanin-conjugated anti-mouse CD45 mAb	559864 (clone 30F11)	BD Biosciences
V500-conjugated anti-human CD45 mAb	560777 (clone HI30)	BD Biosciences
active caspase-9	88-7006-42	eBiosciences

Figures:

Figure 1

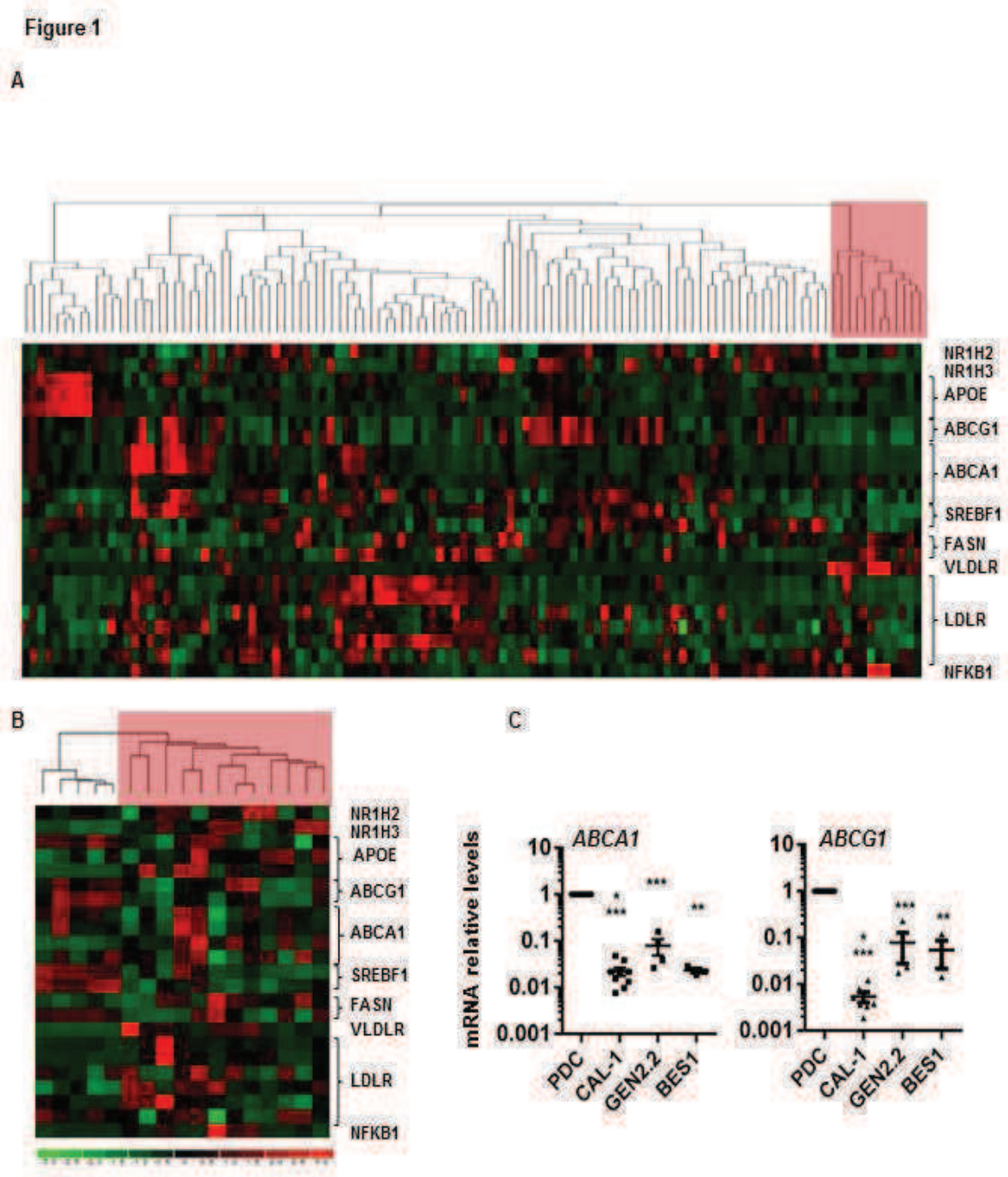
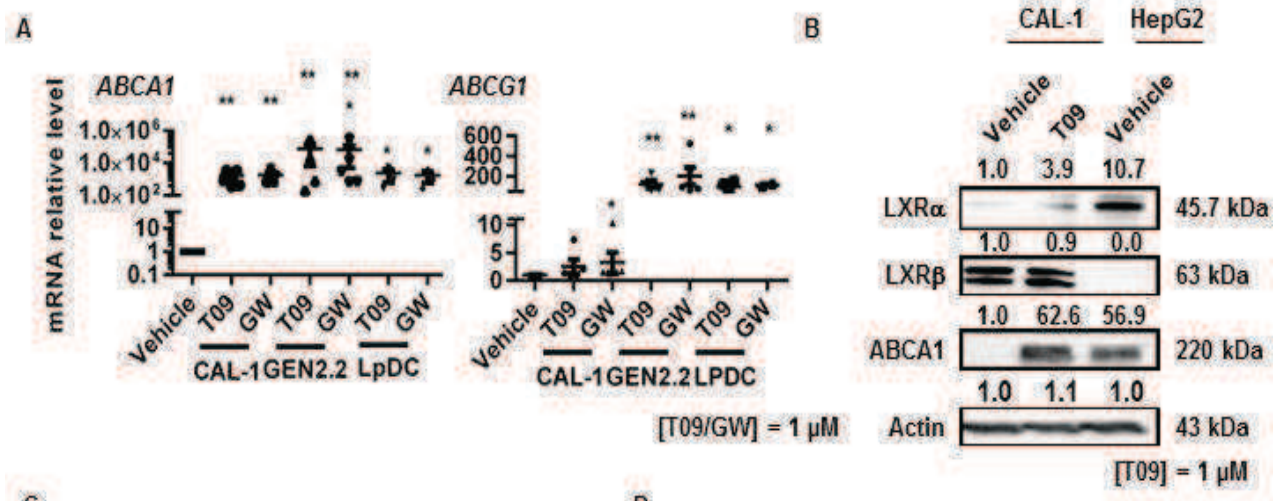
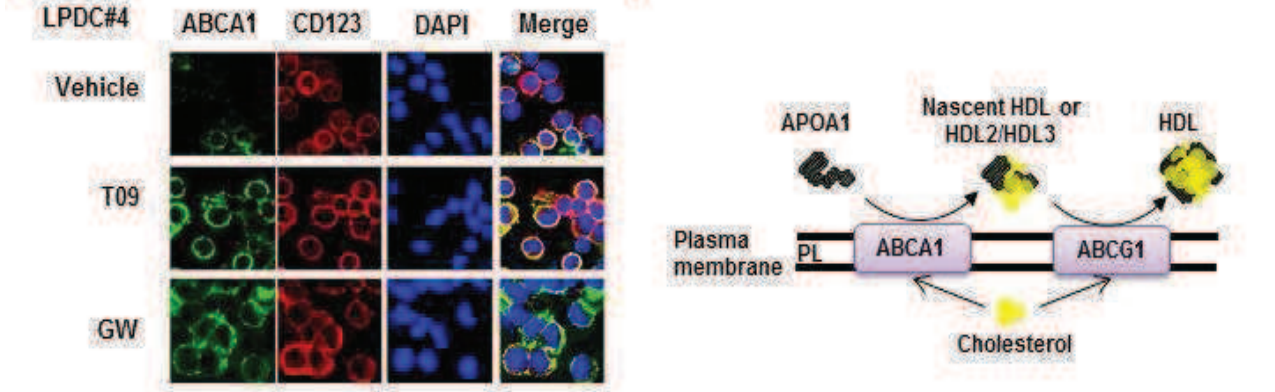


Figure 1: A BPDCN-specific transcriptomic signature with a downregulation of genes involved in cholesterol homeostasis allows the clustering of BPDCN samples.

A. Transcriptomic analysis of 65 AML, 35 T-ALL and 12 BPDCN samples (highlighted in red, right-hand side of the panel) was performed using an affymetrix U133-2 chip and Dchip software. B. Transcriptomic analysis of the 12 BPDCN samples were compared with 5 primary PDC samples performed using an affymetrix U133-2 chip and Dchip software. C. LXR target gene (abca1, abcg1) transcripts were quantified by qRT-PCR in two established BPDCN cell lines, CAL-1 (n=7), and GEN2.2 cells (n=4), as well as in a short term BPDCN cell line, BES1 (n=3). Levels of mRNA expression were normalized on the expression of normal PDC. Results from n independent experiments with each symbol representing an experiment (* $p<0.05$, **$p<0.01$, **** $p<0.0001$, Mann-Whitney).

Figure 2


A
ABCA1
ABCG1
mRNA relative level
Vehicle
T09
GW
CAL-1
GEN2.2
LpDC
LPDC
[T09/GW] = 1 µM
B
CAL-1
HepG2
Vehicle
T09
LXRα
LXRβ
ABCA1
Actin
45.7 kDa
63 kDa
220 kDa
43 kDa
[T09] = 1 µM


C
LPDC#4
ABCA1
CD123
DAPI
Merge
Vehicle
T09
GW
[T09/GW] = 1 µM
D
APOA1
Nascent HDL or
HDL2/HDL3
HDL
Plasma
membrane
PL
ABCA1
ABCG1
Cholesterol

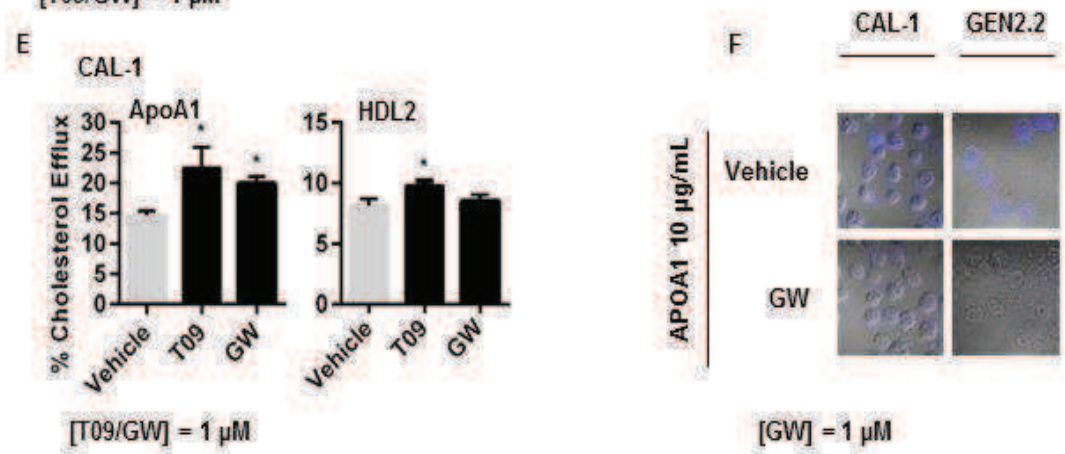

E
CAL-1
ApoA1
HDL2
% Cholesterol Efflux
Vehicle
T09
GW
[T09/GW] = 1 µM
F
CAL-1
GEN2.2
APOA1 10 µg/mL
Vehicle
GW
[GW] = 1 µM

Figure 2: LXR activation restores cholesterol homeostasis-related gene expression and induces cholesterol efflux from BPDCN.

A. BPDCN cell lines (CAL-1, GEN2.2, BES1) and blood samples from three patients diagnosed with BPDCN (LPDC) were treated with 1 µM of LXR agonists, T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. ABCA1 and ABCG1 mRNA levels were determined by qRT-PCR in CAL-1 (n=5), GEN2.2 (n=5), BES1 cells (N=3) and in blood samples containing more than 60% of leukemic PDC (n=3). Results were normalized for each sample on untreated cells (* $p<0.05$, **$p<0.01$,**** $p<0.0001$, Mann-Whitney). B. CAL-1 cells were treated with 1 µM of T0901317 or vehicle control alone. LXRα and LXRβ isoform, as well as ABCA1 protein expression were evaluated by Western blot. The human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was used as control and reference for LXRα expression, while untreated CAL-1 lysates were used as reference for LXRβ and actin expression. Expression of LXR proteins was compared to actin expression. Results from one experiment out of 3 are shown. C. Primary BPDCN cells from one patient (LPDC#4) were treated with 1 µM of LXR agonist T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. Expression of CD123 (as a BPDCN-specific marker) and ABCA1 was assessed by confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI. D. This cartoon represents the cholesterol efflux experiments. Cholesterol is excluded from cells through ABCA1 and/or ABCG1 transporters. Lipid-poor APOA1 accepts cholesterol (yellow symbols) from cells through ABCA1-mediated cholesterol efflux. This induces nascent HDL formation which then accepts supplemental cholesterol loading via ABCG1-mediated efflux. Addition of HDL2 implicates only ABCG1-mediated cholesterol efflux. Cartoon was adapted from reference (12). E. Cholesterol efflux was assessed using [3H]-cholesterol-acetylated LDL-loaded CAL-1 cells treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. Cholesterol efflux was triggered by the addition of 20 µg/mL lipid-poor HDL2 (right panel, n=4) or 10 µg/mL of APOA1 (left panel, n=3). Data were expressed as percentage of cholesterol efflux (mean ± SEM of n experiments), as described in Material and methods section (* $p< 0.05$, Mann–Whitney). F. Cholesterol content of BPDCN cells was assessed after treatment with GW3965 (1µM) for 24 h followed by a 4 h incubation with APOA1 cholesterol acceptor (10 µg/mL). Cholesterol content was determined using filipin staining analyzed by confocal microscopy. One representative experiment out of 3 for CAL-1 cells, and one out of 2 for GEN2.2 cells is shown. LPDC represents data of a blood sample from one patient out of two tested. The PDC marker CD123 allows identification of leukemic PDC in blood samples.

Figure 3

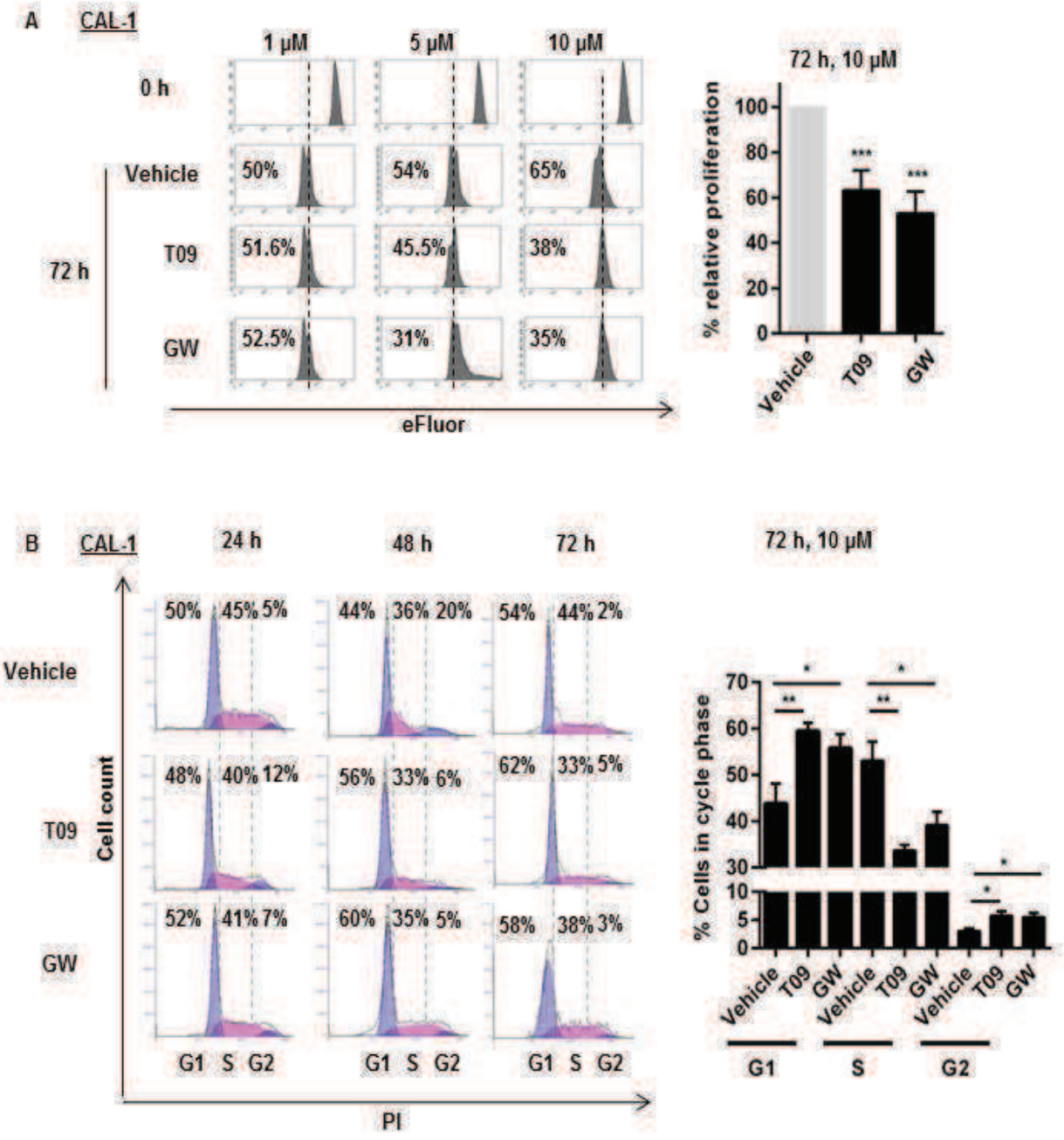

A
CAL-1
1 µM
5 µM
10 µM
0 h
Vehicle
T09
GW
72 h
50%
54%
65%
51.6%
45.5%
38%
52.5%
31%
35%
eFluor
72 h, 10 µM
% relative proliferation
100
80
60
40
20
0
***
***
Vehicle
T09
GW
B
CAL-1
24 h
48 h
72 h
72 h, 10 µM
Vehicle
T09
GW
Cell count
50% 45% 5%
44% 36% 20%
54% 44% 2%
48% 40% 12%
56% 33% 6%
62% 33% 5%
52% 41% 7%
60% 35% 5%
58% 38% 3%
G1 S G2
G1 S G2
G1 S G2
PI
% Cells in cycle phase
70
60
50
40
30
10
5
0
*
**
*
**
*
*
Vehicle
T09
GW
Vehicle
T09
GW
Vehicle
T09
GW
G1
S
G2

Figure 3: LXR activation inhibits BPDCN cells proliferation.

A. Left panel: Efluor-labeled CAL-1 cells were treated with increasing non cytotoxic concentrations (1, 5 and 10 µM) of LXR agonists, T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 72 h. Cell proliferation was assessed by eFluor dilution analyzed by flow cytometry. Histograms show one representative experiment out of 10. Right panel: cumulative data from the 10 independent experiments are expressed as relative proliferation (mean ± SEM) with the vehicle condition being considered as 100%. Data depicted for LXR agonist treatment illustrate the highest concentration, 10 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) (***$p<0.001$, Wilcoxon). B. Left panel: CAL-1 cells were treated with 10 µM of T09, GW or Vehicle control for 24, 48 or 72 h. Cell cycle phase distribution was assessed by cytometry (n=5). Right panel: cumulative data from 5 independent experiments are expressed as percentage of cells in each cycle phase (mean ± SEM) for the highest concentration of LXR agonists 10 µM (*$p<0.05$, **$p<0.01$,***$p<0.001$, Wilcoxon).

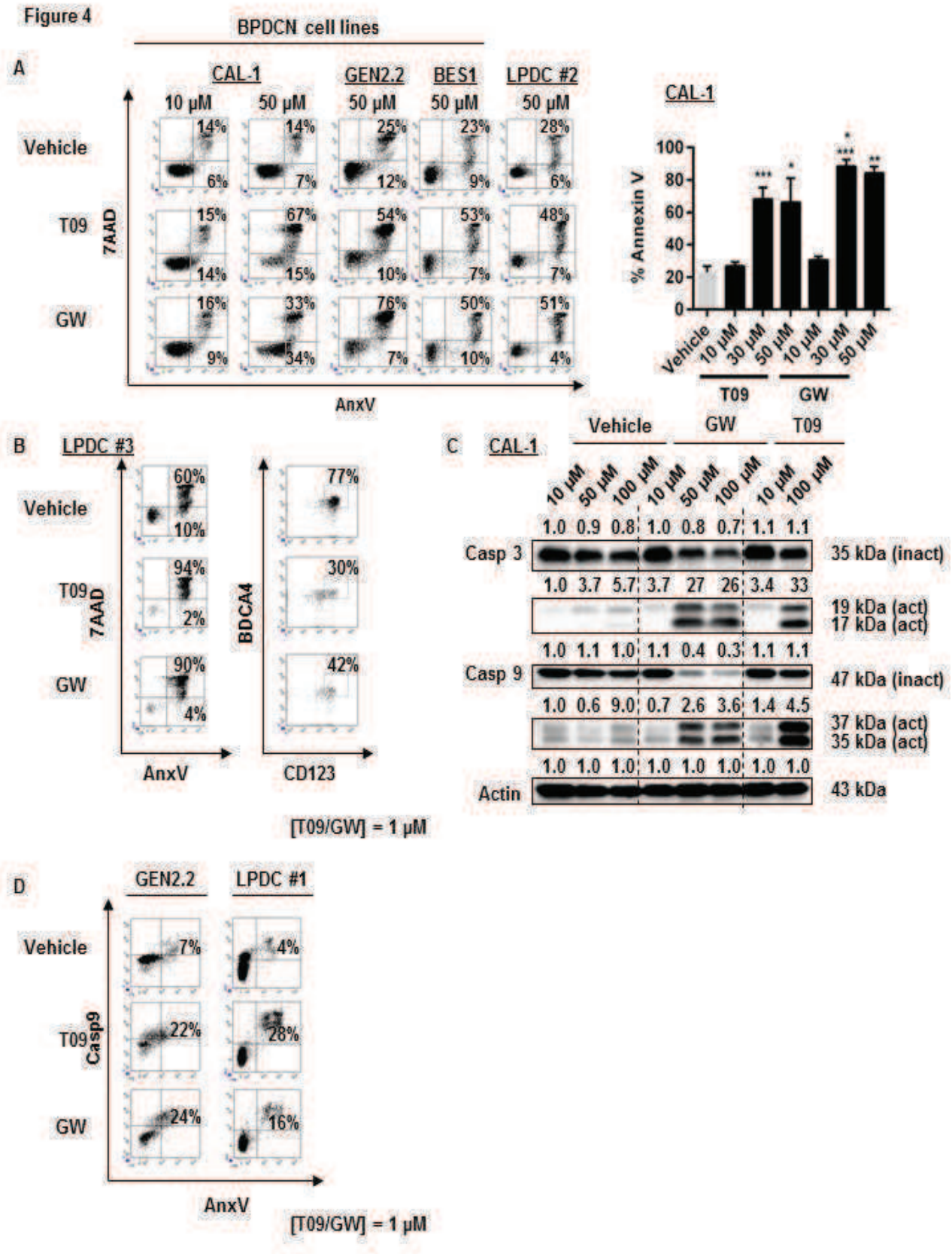


Figure 4
BPDCN cell lines
A
CAL-1
GEN2.2
BES1
LPDC #2
10 µM
50 µM
50 µM
50 µM
50 µM
Vehicle
T09
GW
7AAD
AnxV
14%
6%
14%
7%
25%
12%
23%
9%
28%
6%
15%
14%
67%
15%
54%
10%
53%
7%
48%
7%
16%
9%
33%
34%
76%
7%
50%
10%
51%
4%
CAL-1
% Annexin V
Vehicle
10 µM
30 µM
50 µM
10 µM
30 µM
50 µM
T09
GW
B
LPDC #3
Vehicle
T09
GW
7AAD
AnxV
BDCA4
CD123
60%
10%
94%
2%
90%
4%
77%
30%
42%
[T09/GW] = 1 µM
C
CAL-1
Vehicle
GW
T09
10 µM
50 µM
100 µM
10 µM
50 µM
100 µM
10 µM
100 µM
Casp 3
1.0 0.9 0.8 1.0 0.8 0.7 1.1 1.1
35 kDa (inact)
1.0 3.7 5.7 3.7 27 26 3.4 33
19 kDa (act)
17 kDa (act)
Casp 9
1.0 1.1 1.0 1.1 0.4 0.3 1.1 1.1
47 kDa (inact)
1.0 0.6 9.0 0.7 2.6 3.6 1.4 4.5
37 kDa (act)
35 kDa (act)
Actin
1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0
43 kDa
D
GEN2.2
LPDC #1
Vehicle
T09
GW
Casp9
AnxV
7%
4%
22%
28%
24%
16%
[T09/GW] = 1 µM

Figure 4: LXR activation in BPDCN induces apoptotic cell death

A. Left panel: BPDCN cell lines (CAL-1, GEN2.2, BES1) and a blood sample from one patient diagnosed with BPDCN (LPDC#2) were treated with increasing concentrations (10 – 50 µM) of LXR agonists T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. Cell viability was assessed by AnxV and 7AAD staining and cytometry. Dot plots illustrate data obtained with cells treated with 50 µM of LXR agonists, except for CAL-1 cells that were treated with 10 and 50 µM. Results from one representative experiment out of 6 for CAL-1, one out of 4 for GEN2.2 cells and one sample out of 2 primary LPDC#2 samples tested. Right panel represents the percentage (mean ± SEM from 6 independent experiments) of dead AnxV+ CAL-1 cells after LXR agonist treatment (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Mann-Whitney). B. One freshly isolated PBMC sample obtained from a patient diagnosed with BPDCN was treated with 50 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. Cytometry dot plots represent the percentage of BPDCN cells (identified by CD123/BDCA4 staining) in the blood sample into the viable cell fraction (i.e., the AnxV–/7AAD– fraction). The percentage of dead cells increases from 70% to 96 and 94% in vehicle-, T09- and GW-treated cells, respectively. Of note, the percentage of viable BPDCN cells decreases from 77% to 30 and 42% in the same treatment conditions. C. CAL-1 cells were treated with increasing concentrations of LXR agonists, T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 6 h. Analysis of full length inactive (inact.) and cleaved active (act.) forms of caspase-3 and caspase-9 was performed by Western blot. Expression of these proteins was compared with actin expression. Results from 1 representative experiment out of 2. D. BPDCN cells (GEN2.2 and one primary BPDCN sample, LPDC#1) were treated with 50 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW), for 6 h. Caspase 9 activation on 7AAD negative cell fraction (excluding late apoptotic and necrotic cells) were assessed by cytometry. Dot plots represent 1 experiment with GEN2.2 representative of 2, and 1 experiment for LPDC#1.

Figure 5

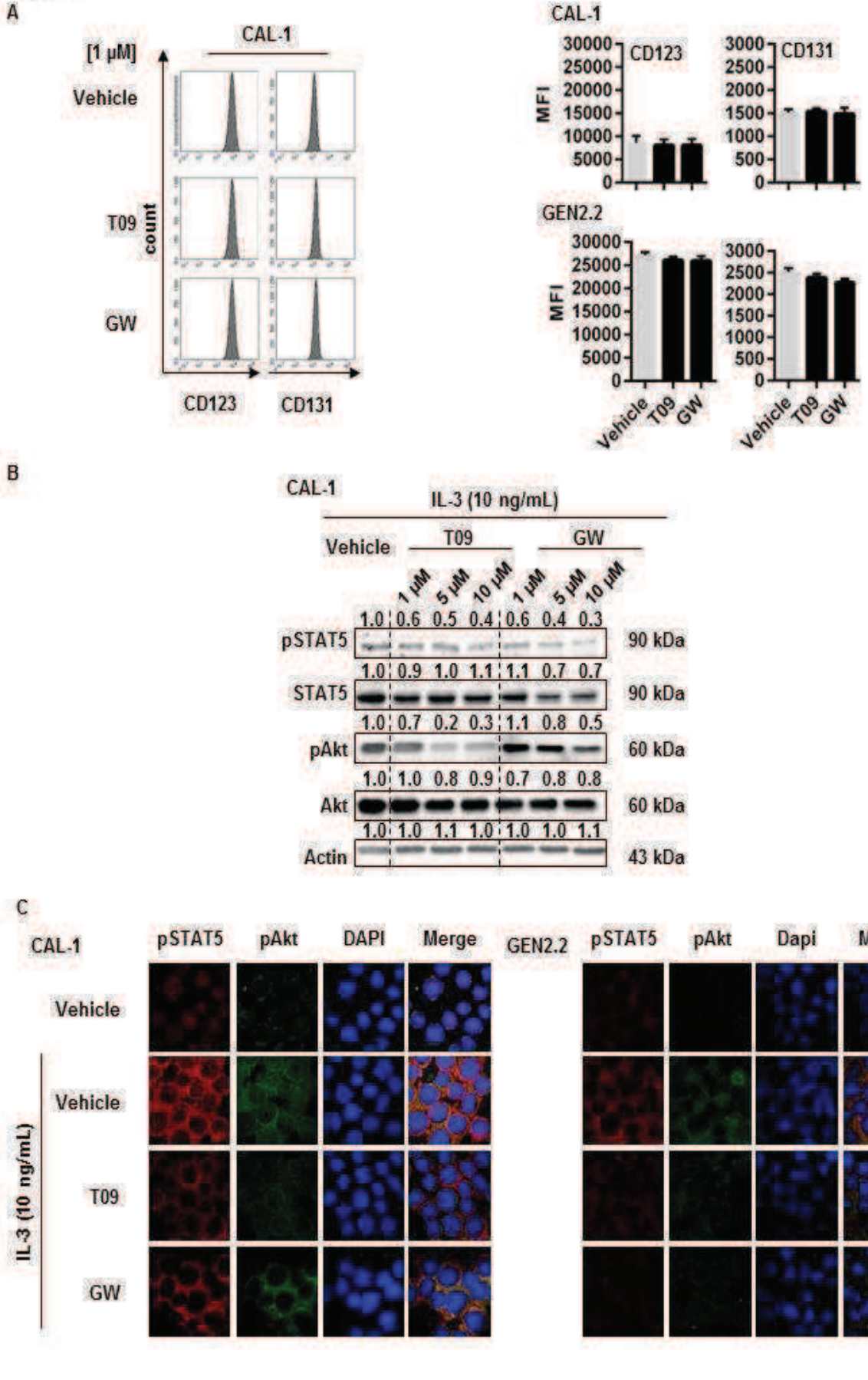

A
CAL-1
[1 μM]
Vehicle
T09
GW
count
CD123
CD131
CAL-1
CD123
CD131
MFI
GEN2.2
Vehicle
T09
GW
B
CAL-1
IL-3 (10 ng/mL)
Vehicle
T09
GW
1 μM
5 μM
10 μM
pSTAT5
STAT5
pAkt
Akt
Actin
90 kDa
60 kDa
43 kDa
C
CAL-1
GEN2.2
pSTAT5
pAkt
DAPI
Dapi
Merge
Vehicle
T09
GW
IL-3 (10 ng/mL)

Figure 5: LXR activation in BPDCN cells interferes with IL-3 signaling pathway.

BPDCN cell lines CAL-1 and GEN2.2 were treated with 1 µM of LXR agonists T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. A. Right panel: CD123 and CD131 expression were assessed by cytometry. Histograms represent one representative experiment out of 4 (right panel). Left panel: cumulative data of 4 experiments expressed as mean fluorescent intensity (MFI) ± SEM (left panel). B. CAL-1 cells were treated with increasing concentrations (1, 5 or 10 µM) of LXR agonists (T09 or GW) for 24 h, followed by 10 ng/mL of IL-3 for 30 minutes. Phospho-STAT5 (Y694), phospho-Akt (S473), as well as unphosphorylated corresponding protein expression was assessed by Western blot, expression of these proteins was compared with Actin. The vehicle condition was used as reference for phosphor-protein and total protein expression. Results of 1 representative experiment out of 2. C. Cells were treated with 1 µM of LXR agonists for 24 h. Phospho-STAT5 (Y694), and phospho-Akt (S473) was assessed by confocal microscopy after IL-3 stimulation (10 ng/mL for 30 min). Results of 1 representative experiment out of 5 for CAL-1, 1 out of 3 for GEN2.2 cells.

Figure 6

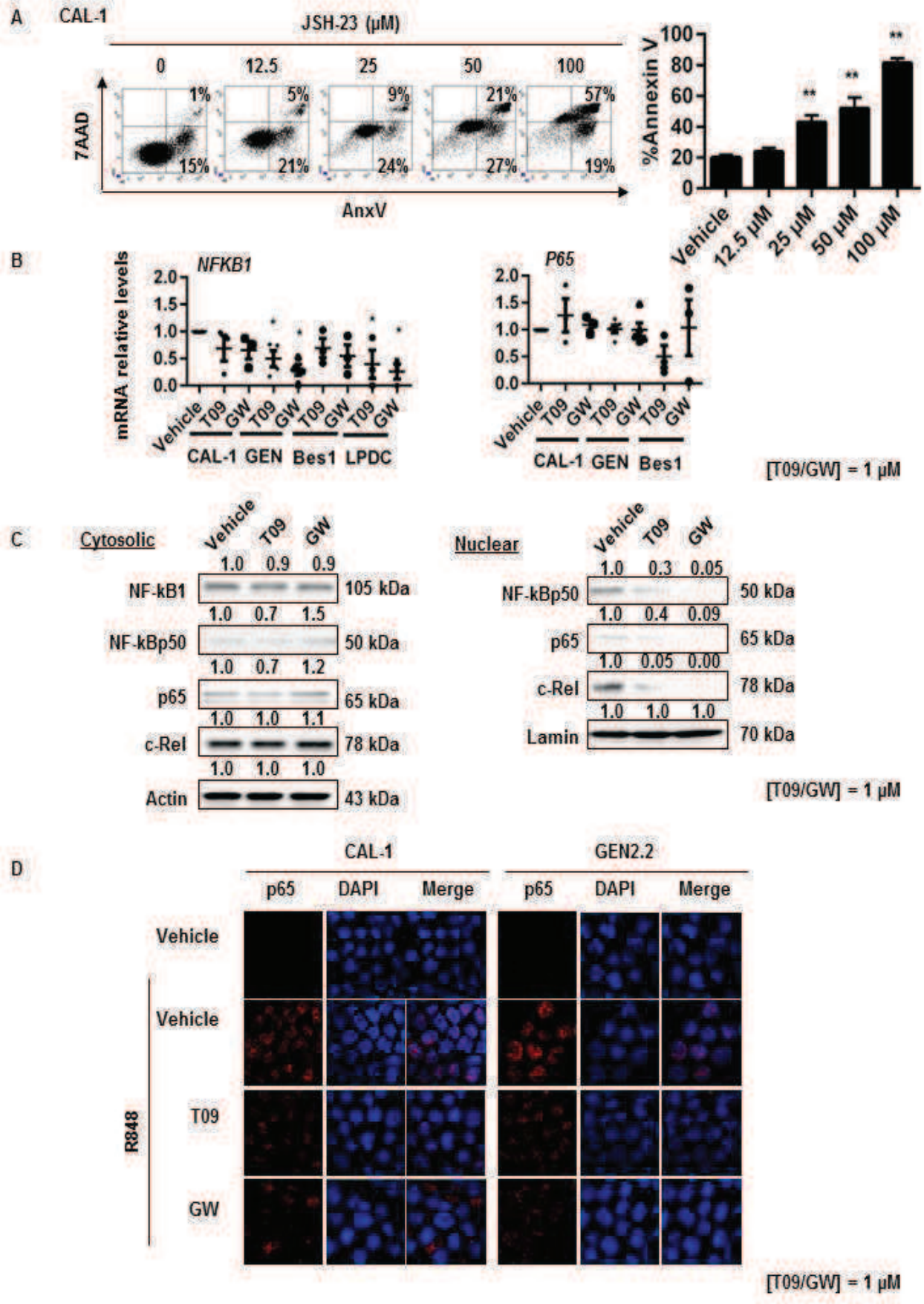

A
CAL-1
JSH-23 (μM)
0
12.5
25
50
100
1%
5%
9%
21%
57%
15%
21%
24%
27%
19%
7AAD
AnxV
%Annexin V
Vehicle
12.5 μM
25 μM
50 μM
100 μM
B
NFKB1
P65
mRNA relative levels
Vehicle
T09
GW
CAL-1
GEN
Bes1
LPDC
[T09/GW] = 1 μM
C
Cytosolic
Nuclear
NF-kB1
NF-kBp50
p65
c-Rel
Actin
Lamin
105 kDa
50 kDa
65 kDa
78 kDa
43 kDa
70 kDa
[T09/GW] = 1 μM
D
CAL-1
GEN2.2
p65
DAPI
Merge
Vehicle
T09
GW
R848
[T09/GW] = 1 μM

Figure 6: LXR agonist activation in BPDCN inhibits NF-kB activation.

A. CAL-1 cells were treated with increasing concentrations (12.5, 25, 50 and 100 µM) of NF-kB inhibitor JSH23. Cell death was performed by annexinV/7AAD staining, analyzed by cytometry. Dot plots from one representative experiment out of 5 and cumulative data from these 5 experiments expressed as percentage of dead AnxV+ cells are shown (left panel). Cumulative data from the n experiments expressed as mean + S.E.M. are shown (right panel), (*$p<0.05$,**$p<0.01$, Mann-Whitney). B. BPDCN cell lines (CAL-1 and GEN2.2 cells), short term expanded primary BPDCN sample BES1 and blood samples of three different patients diagnosed with BPDCN (LPDC) were treated with 1 µM of LXR agonists T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. NfKB1 and P65 mRNA levels were assessed by qRT-PCR. Results from 4 independent experiments for BPDCN lines are shown. (*$p<0.05$ Mann-Whitney). C. CAL-1 cells were treated with 1 µM of T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h, followed by R848 (1 µg/mL) stimulation for 6 h. Cytosolic and nuclear protein fractions were isolated as described in the methods section. NF-κB1 (p105), p50, p65 and c-Rel proteins were analyzed by Western blot and expression of these proteins were compared with Actin and Lamin B expression for cytosolic or nuclear expression, respectively. Results from 1 representative experiment out of 3. The vehicle condition was used as reference for protein expression. D. BPDCN cells were treated with 1 µM of LXR agonists for 24 h, followed by 1 µg/mL of R848 for 45 minutes. P65 phosphorylation (pS536) was assessed by confocal microscopy (one representative experiment out of 4).

Figure 7

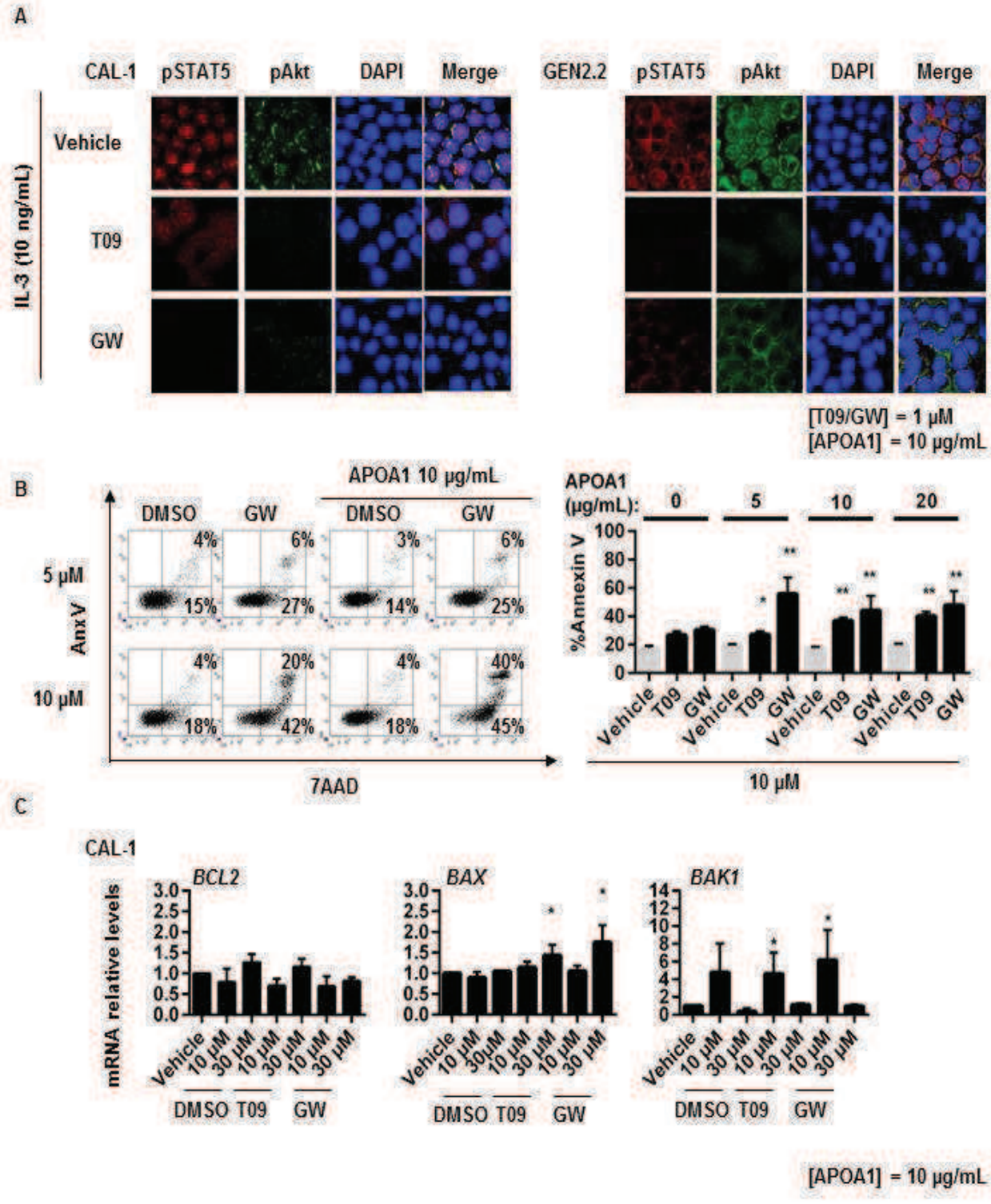

A
CAL-1
pSTAT5
pAkt
DAPI
Merge
GEN2.2
IL-3 (10 ng/mL)
Vehicle
T09
GW
[T09/GW] = 1 µM
[APOA1] = 10 µg/mL
B
APOA1 10 µg/mL
DMSO
GW
5 µM
10 µM
AnxV
7AAD
4%
6%
3%
15%
27%
14%
25%
20%
40%
18%
42%
45%
APOA1 (µg/mL):
0
5
10
20
%Annexin V
Vehicle
T09
GW
10 µM
C
CAL-1
mRNA relative levels
BCL2
BAX
BAK1
Vehicle
10 µM
30 µM
DMSO
T09
GW
[APOA1] = 10 µg/mL

Figure 7: Cholesterol efflux stimulation in BPDCN amplifies LXR activation-induced effects.

BPDCN cell lines CAL-1 and GEN2.2 were treated with 1 µM of LXR agonists T0901317 (T09) or GW3965 (GW) for 24 h. A. Phospho-STAT5 (Y694), and phospho-Akt (S473) were assessed by confocal microscopy after LXR stimulation, followed by APOA1 (10 µg/mL) addition for 4 h, and then IL-3 stimulation (10 ng/mL for 30 min). Data from one representative experiment out of 2 for CAL-1, and GEN2.2 cells are shown. B. CAL-1 cells were treated with 10 µM of T0901317 or GW3965 simultaneously to increasing concentrations of APOA1 (5, 10 or 20 µg/mL) for 24 h. Cell death was assessed by AnxV/7AAD staining analyzed by cytometry. Dot plots from one representative experiment out of 6 are shown (right panel). Cumulative data from the 6 independent experiments expressed as mean ± SEM of dead AnxV+ cells are shown (*$p<0.05$, **$p<0.01$, Mann-Whitney). C. CAL-1 cells were treated with increased concentration of LXR agonists (10 µM and 30 µM) or vehicle (DMSO), simultaneously to APOA1 (10 µg/mL) for 6 h. Then, mRNA expression of BCL2, BAX, and BAK1 was quantified by qRT-PCR. Cumulative data from 4 independent experiments expressed as mean ± SEM of relative mRNA expression are shown. (*$p<0.05$, **$p<0.01$,***$p<0.001$, Wilcoxon).

Figure 8

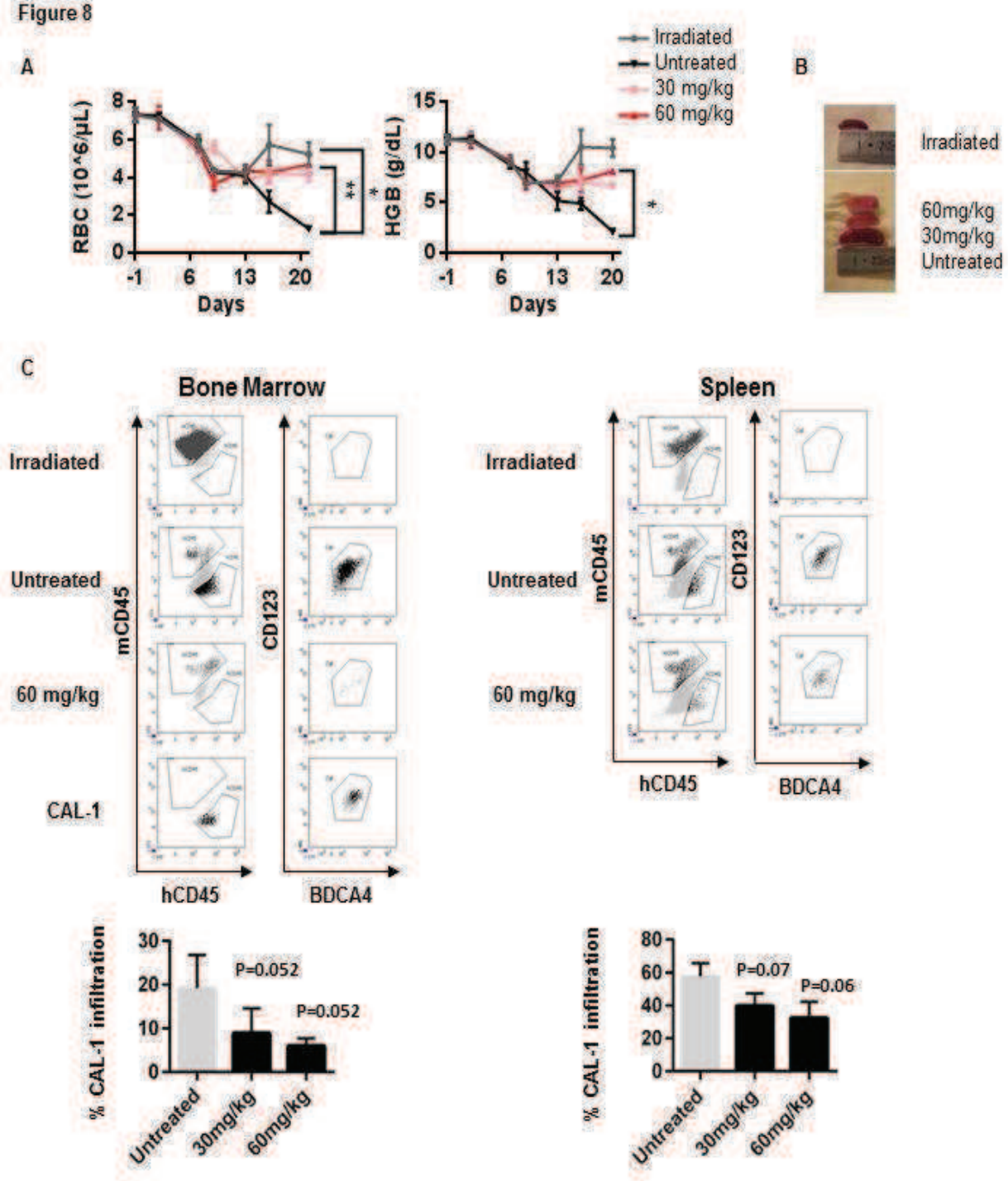

A
Irradiated
Untreated
30 mg/kg
60 mg/kg
RBC (10^6/µL)
HGB (g/dL)
Days
**
*
B
Irradiated
60mg/kg
30mg/kg
Untreated
C
Bone Marrow
Spleen
Irradiated
Untreated
60 mg/kg
CAL-1
mCD45
CD123
hCD45
BDCA4
% CAL-1 infiltration
P=0.052
P=0.052
P=0.07
P=0.06
Untreated
30mg/kg
60mg/kg

Figure 8: In vivo LXR agonist treatment limits BPDCN-induced cytopenia and spleen and bone marrow infiltration by BPDCN.

NSG mice were sublethally irradiated (2 Gy) and then injected intravenously with 1x106 CAL-1 cells. After 7 days, mice were treated with two doses of the LXR agonist T0901317 (30 mg/kg or 60 mg/kg) or with vehicle control (PBS/DMSO 50%) every two days, until the end of the experiments (4 mice per group, 3 independent experiments). A. Blood samples were collected every 4 days to assess red blood cell (RBC) and platelet (Plt) count, as well as hemoglobin (Hb) concentration. Cumulative data expressed as mean + S.E.M. are shown, (*$p<0.05$, **$p<0.01$, Mann-Whitney). B. At the end of the experiments (J20 ± 2), spleens were extracted and measured to evaluate BPDCN spleen involvement. C. Spleens and bone marrows were collected in order to perform CAL-1 cell quantification. Cells were stained with the following antibodies: human CD45 (hCD45), murine CD45 (mCD45), CD123 and BDCA4 and analyzed by cytometry. Dot plots illustrate the gating strategy with identification of murine cells using mCD45 gating with irradiated mice as used as control. Human CAL-1 cells were identified using hCD45, CD123 and BDCA4 staining. Cultured CAL-1 cells were used as control for this staining. Percentage of cell infiltration was calculated as follows: CAL-1 count/(CD45h + CD45m counts). Histograms represent cumulative data of one experiment out of 3 expressed as mean ± SEM of CAL-1 infiltration percentage from 5 mice.

FIGURE S1

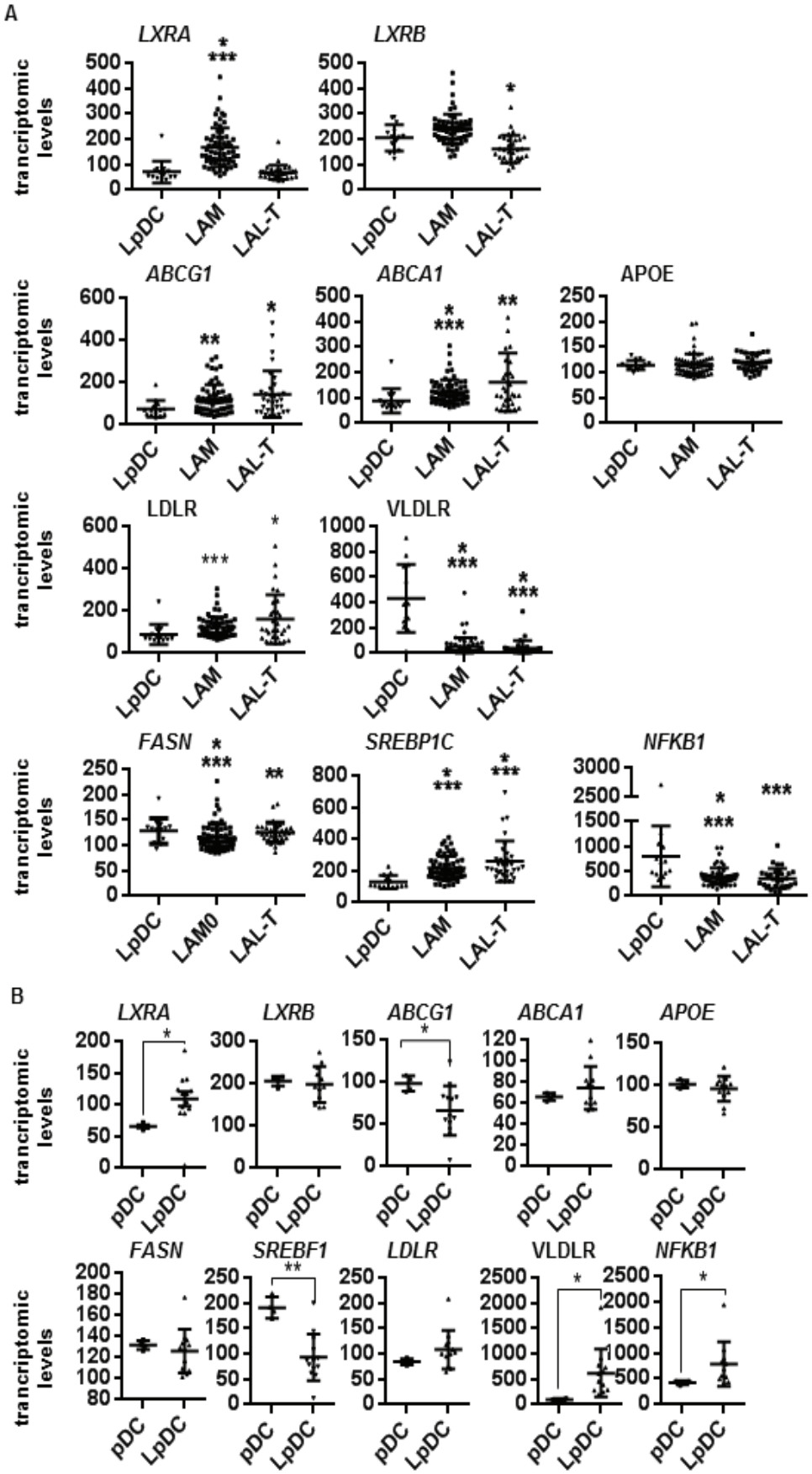

A
LXRA
LXRB
ABCG1
ABCA1
APOE
LDLR
VLDLR
FASN
SREBP1C
NFKB1
tranciptomic levels
LpDC
LAM
LAL-T
LAM0
B
pDC
LpDC
SREBF1

Figure S1: BPDCN transcriptomic signature shows a basal LXR related gene downregulation compared to AML/ALL and primary PDC.

Transcriptomic analysis of 65 AML, 35 T-ALL and 12 BPDCN samples (highlighted in red, right-hand side of the panel) and 5 primary PDC samples performed using an affymetrix U133-2 chip and Dchip software. Transcriptomic levels provides by Dchip software were cumulates for LXR coding genes, (LXRA, LXRB), LXR target gene related to cholesterol efflux protein (ABCA1, ABCG1, APOE), cholesterol infflux related protein coding genes (LDLR, VLDLR), LXR target gene related to fatty acid homeostasis (FASN, SREBF1), and NFKB1. A. Comparison of gene transcription for the BPDCN, AML and ALL samples. B. Comparison of gene transcription for BPDCN and primary PDC samples.

Cumulative data were express as mean (full line) ±SEM, (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, Mann-Whitney).

FIGURE S2

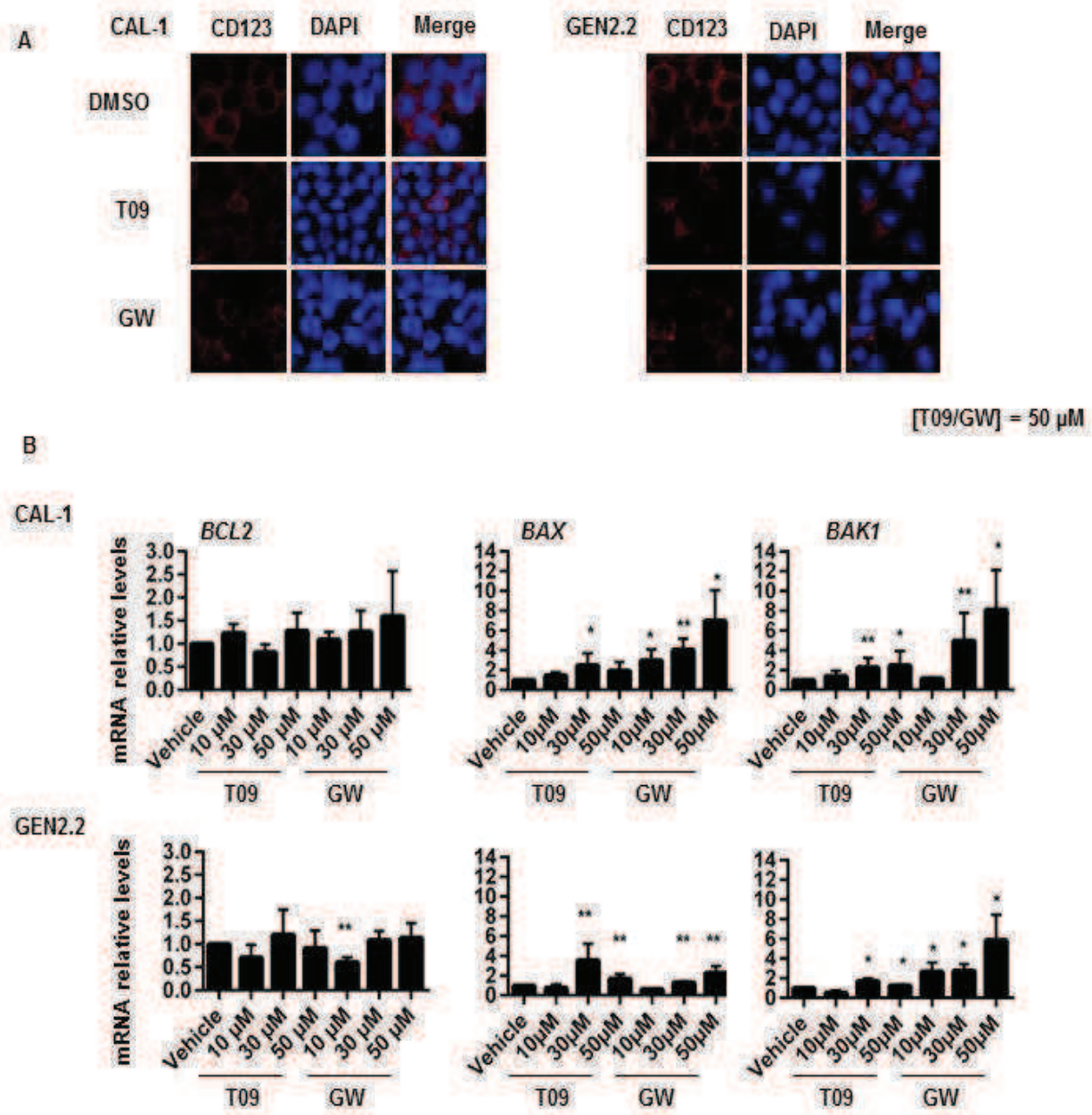

A
CAL-1
CD123
DAPI
Merge
GEN2.2
CD123
DAPI
Merge
DMSO
T09
GW
[T09/GW] = 50 µM
B
CAL-1
BCL2
BAX
BAK1
mRNA relative levels
Vehicle
10 µM
30 µM
50 µM
T09
GW
GEN2.2

Figure S2: LXR agonists induce BPDCN cell death.

A. CAL-1 and GEN2.2 cells were treated with 50 µM of T09 or GW, for 6 hours. Nuclear cell fragmentation was assessed by CD123 and DAPI staining, analyzed by confocal microscopy (1 representative of 3). B. CAL-1 or GEN2.2 cells were treated with 10 or 30 µM of T09 or GW LXR agonists, for 6 hours. BCL2, BAX and BAK1 mRNA levels were assessed by qRT-PCR. Cumulative data from n=4 experiment for CAL-1 and GEN2.2 express as mean ± SEM. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, Mann-Whitney).

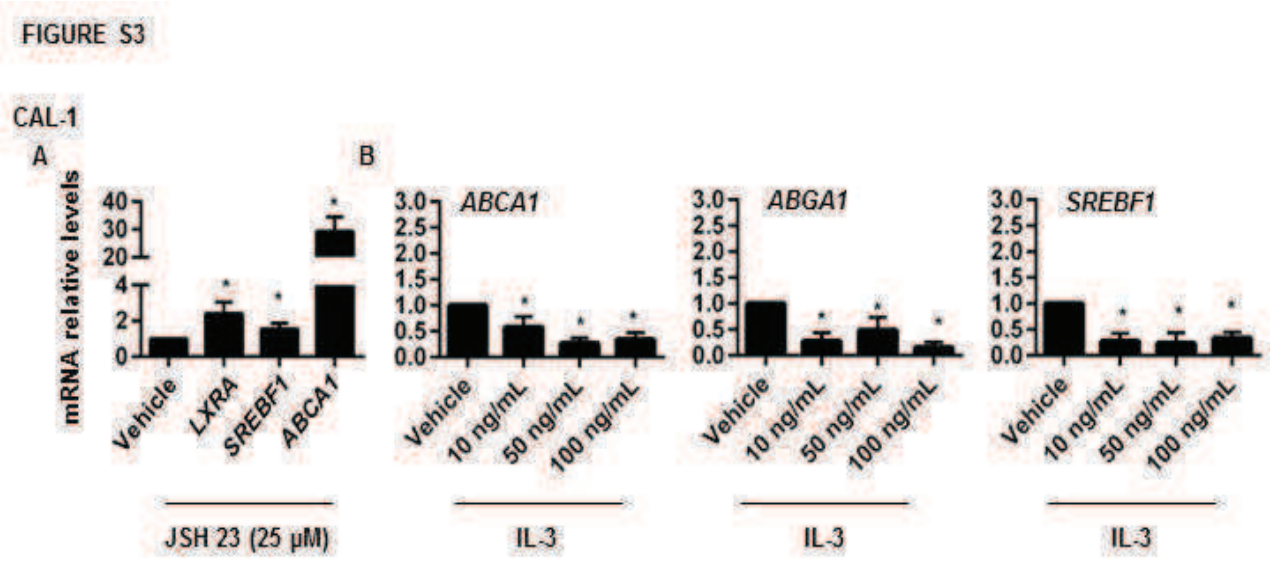


Figure S3: NF-κB and IL-3 stimulation repress LXR in BPDCN cells.

A. CAL-1 cells were treated with 25 µM of the NF-κB p65 inhibitor JSH-23, for 24 hours. LXR target gene expression (LXRA, ABCA1, SREBF1) were evaluated by qRT-PCR (n=4). B. CAL-1 cells were treated with increasing concentrations of IL-3 (10, 50 and 100 ng/mL) for 24 hours. LXR target gene expression (ABCA1, ABCG1 and SREBF1) were evaluated by qRT-PCR (n=4).

Cumulative data from n experiments were express as mean ± SEM. (*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, Mann-Whitney).

2. Données complémentaires à l'étude

En complément à ces travaux, nous avons étudié plus en détail la mort cellulaire induite par les LXR. Nous avons observé que les traitements agonistes LXR activaient la voie d'apoptose intrinsèque (*via* la caspase 9). Cette activation peut être due à la régulation de NF-κB *via* BCL2 (422).

Nous avons également observé une activation de la caspase 8 observable par Western blot sur la lignée CAL-1, et par marquage en cytométrie en flux sur lignée GEN2.2 et un échantillon de LPDC primaire (Figure 25), témoignant de l'activation de la voie d'apoptose extrinsèque

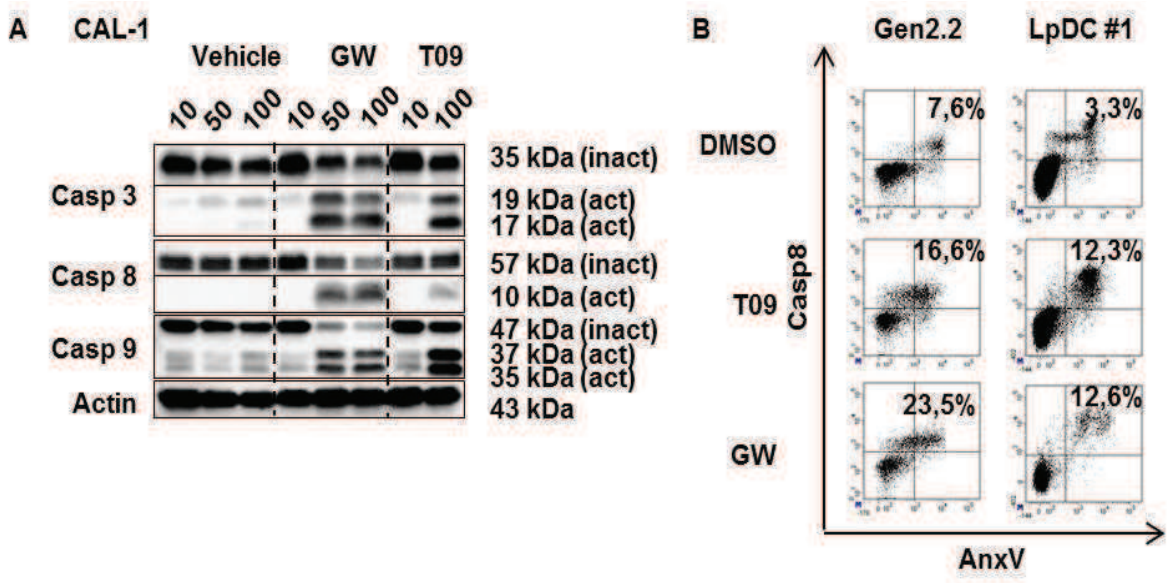


Figure 25 –Les agonistes LXR activent la caspase 8.
A. Des cellules de la CAL-1 ont été traitées avec des concentrations croissantes d'agonistes LXR (10, 50, ou 100 µM) pendant 6 heures. L'activation des caspases-3, -8 et -9 a été évaluée par Western blot (1 expérience représentative de 3). B. Des cellules de la lignée GEN2.2 (n=3) et un échantillon de BPDCN ont été traités pendant 6h avec 30µM d'agoniste LXR. L'activation de la caspase 8 a été déterminée par cytométrie en flux sur les cellules non nécrotiques (7AAD-).

L'apoptose extrinsèque peut impliquer l'interaction de TRAIL avec ses récepteurs sur la cellule cible (comme DR4 et DR5), ainsi que l'activation du récepteur FAS sur les LPDC, par le FASL. Nous avons observé que le traitement des cellules CAL-1 avec des concentrations croissantes d'agoniste LXR (10 ou 30 µM de T09 ou GW) pendant 6 heures, augmentait significativement l'expression du gène *DR4* (Figure 26A). Cette induction, ainsi que l'augmentation de l'expression membranaire de DR4 (données non montrées), était associée à une sensibilisation des cellules à un traitement simultané d'un agoniste LXR (T09 ou GW à 50µM) avec la protéine TRAIL recombinante (Figure 26B). La stimulation des récepteurs TRAIL *in vivo* peut être induite par des cellules NK ou des T cytotoxiques activées (comme discuté dans la référence (441)). Il faudrait confirmer ces résultats sur d'autres BPDCN.

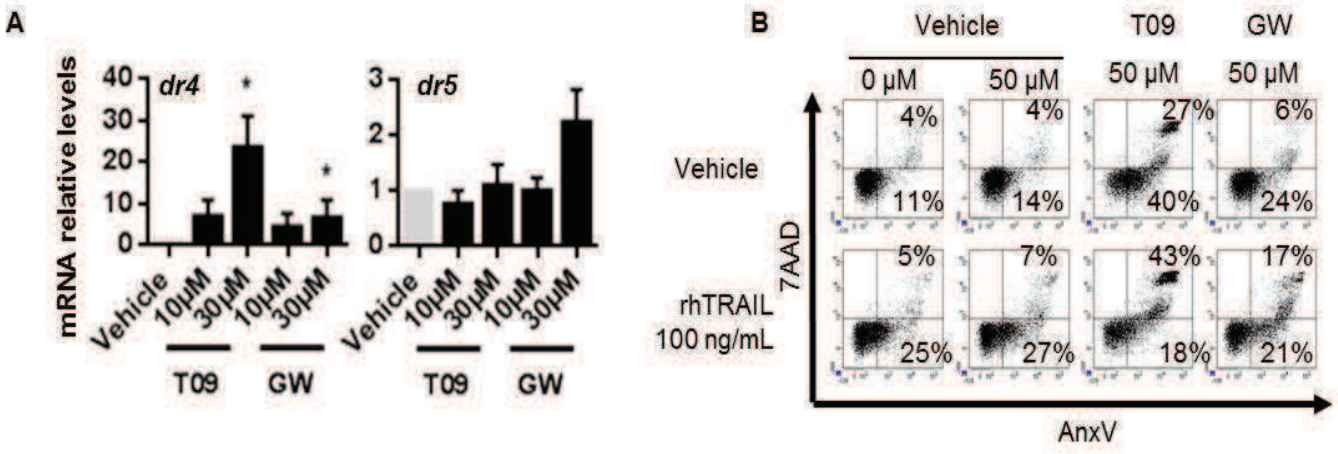


Figure 26 - Les agonistes de LXR sensibilisent les LPDC à la mort induite par TRAIL.
A. Des cellules CAL-1 ont été traitées avec 10 ou 30 µM d'agonistes LXR T09 ou GW, pendant 6 heures. Le niveau d'expression des ARNm des gènes *dr4* et *dr5* a alors été évalué par qRT-PCR. Les données représentent la moyenne d'expression des gènes étudiés lors de 3 expériences indépendantes, exprimée de façon relative à la condition non traitée ± SEM. * p<0,05, selon le test de Mann-Whitney. B. Les cellules CAL-1 ont été traitées avec 50 µM d'agoniste LXR T09 ou GW pendant 6 heures, simultanément ou pas avec 100 ng/mL de TRAIL recombinant. La mortalité cellulaire a été évaluée par marquage AnxV/7AAD, par cytométrie en flux (dot plots provenant de 1 expérience, représentative de 3 expériences réalisées).

L'étude *in vivo* utilisant un modèle de xénogreffe de BPDCN a révélée lors de notre étude une diminution des infiltrats médullaires et spléniques de LPDC, ainsi qu'une prévention de la cytopénie induite par la leucémie. Cependant, l'évaluation de la survie des souris (temps jusqu'à euthanasie des animaux pour cause de signes de leucémie avancée) n'a pas permis de révéler un gain significatif de survie par les traitements avec l'agoniste LXR T09 (+2 jours de survie pour le groupe traité à 60 mg/kg, Figure 27A). Ce résultat pourrait être dû à la toxicité des agonistes LXR déjà énoncée dans la littérature (208). Comme observé Figure 25B, l'inhibition de NF-κB permet une restoration de la voie LXR. Sapienza et ses collègues ont démontré que le traitement par bortézomib (inhibant NF-κB) des cellules CAL-1 induisait la mort des cellules (422). Des expériences préliminaires de notre équipe, utilisant le même modele murin de BPDCN (injection intrapéritonéale bihebdomadère de 0,25mg/kg de bortézomib), n'a cependant démontré qu'un gain de survie comparable au traitement agoniste LXR (+ 2 jours), bien que les concentrations utilisées ne sont pas décrites comme toxiques (638) (données non montrées). En considérant le fait que NF-κB peut inhiber la voie LXR dans les BPDCN (Figure 25B), nous avons émis l'hypothèse qu'un traitement inhibiteur de NF-κB pourrait augmenter les effets des agonistes LXR. Nous avons pu observer que le traitement simultané de cellules CAL-1 avec des doses faiblement cytotoxiques de bortézomib (30 ng/mL) et les agonistes LXR (T09 ou GW à 5 ou 10 µM), avait un effet cytotoxique significatif ($p<0,05$; Figure 27B). Cet effet synergique était augmenté par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de NF-κB, JSH-23 ($p<0,0001$; Figure 27C). Ce résultat démontre l'intérêt de la combinaison de ces deux traitements, permettant la diminution de la dose d'agoniste LXR (et donc de l'effet toxique associé), ainsi qu'une éventuelle potentialisation des effet thérapeutiques des deux molécules.

Ces données complémentaires suggèrent que la répression de la voie LXR dans les BPDCN peut impliquer l'activation de NF-κB, ainsi que la signalisation à l'IL-3. Une étude plus approfondie permettrait d'identifier le mécanisme impliqué. Cependant, nos résultats nous permettent dès lors de conclure à une régulation croisée entre la signalisation induite par l'IL-3 et la voie LXR, tout du moins dans la lignée cellulaire CAL-1.

L'effet cytotoxique des agonistes de LXR impliquant l'activation de la voie d'apoptose extrinsèque dans les LPDC semble donc mettre à contribution la sensibilisation des cellules à TRAIL. Des résultats préliminaires indiquent que les BPDCN expriment TRAIL (CD253) suggérant une mort fratricide en culture (données non montrées).

Enfin, l'effet cytotoxique synergique du bortézomib avec les agonistes LXR observé *in vitro*, est actuellement évalué *in vivo*. Un inhibiteur de NF-κB permet de sensibiliser les cellules CAL-1 à la mort induite par les agonistes de LXR.

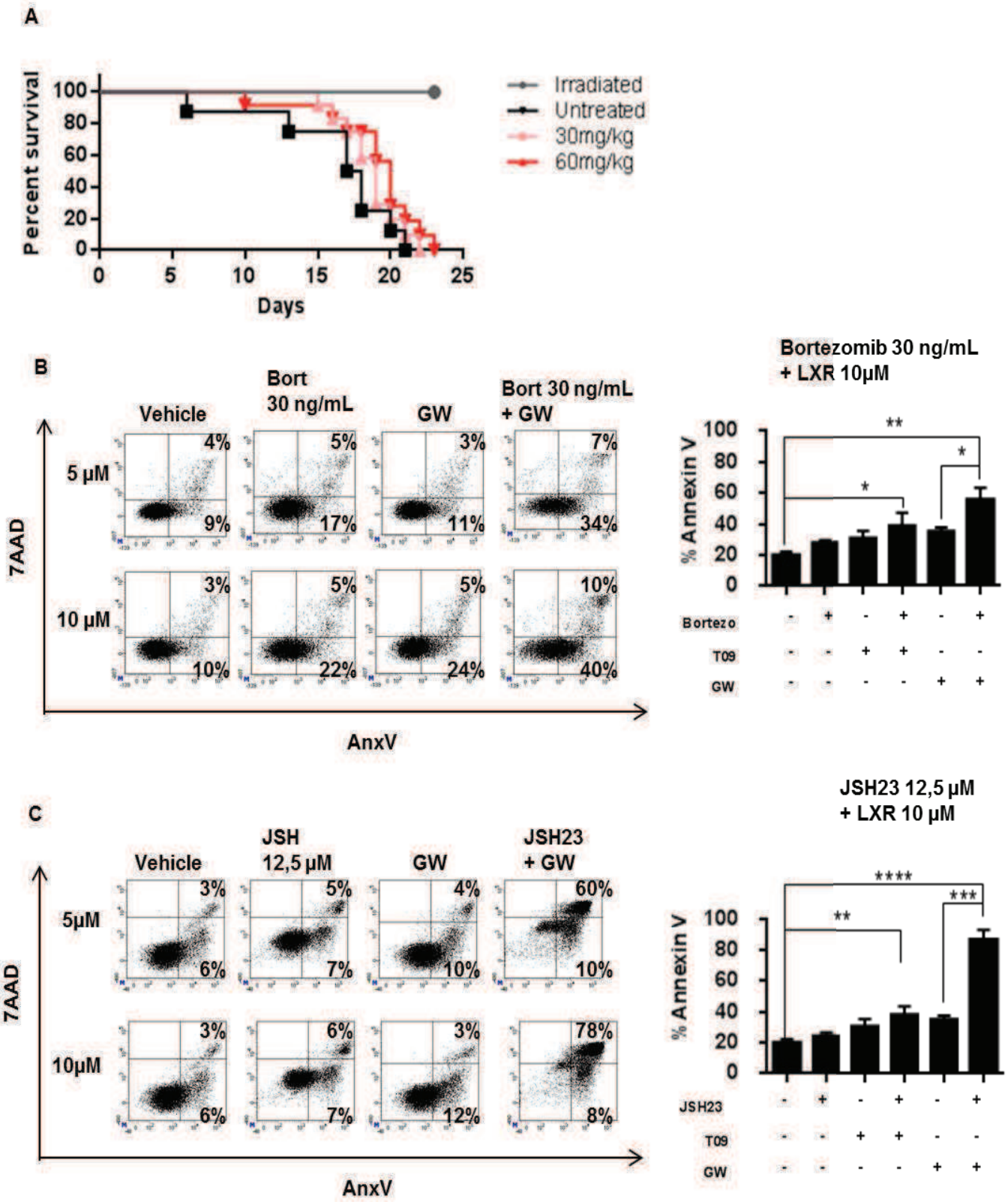


Figure 27 - L'activation de LXR simultanément à l'inhibition de NF-κB augmente l'effet cytotoxique.
A. Des souris NSG ont été irradiées (2 Gy) et greffées avec 1x106 cellules CAL-1 par injection intraveineuse. Après 7 jours, les souris ont été traitées avec deux concentrations d'agoniste LXR T0901317 (30 mg/kg ou 60 mg/kg) ou le solvant seul (PBS/DMSO 50%) tous les deux jours jusqu'à la fin de l'expérience (4 souris par groupe, 3 expériences). Les souris ont été sacrifiées lorsque les signes de la maladie étaient trop prononcés (paralysie du train arrière, posture prostrée, perte d'intégrité du pelage, non activité dans la cage et isolement). B. Des cellules CAL-1 ont été traitées pendant 24h avec les agonistes LXR T0901317 (T09) ou GW3965 (GW) à des concentrations de 5 µM et 10 µM, seul ou simultanément avec du bortezomib à une concentration de 30 ng/mL. La mortalité cellulaire a été évaluée par marquage Annexine V (AV)/7AAD, analysée par cytométrie en flux (n=4). C. De manière similaire, les CAL-1 ont été traitées avec les agonistes LXR seuls ou simultanément avec l'inhibiteur de NF-κB JSH-23 à une concentration finale de 12,5 µM (n=6). Les images brutes de cytométrie sont représentatives de 4 ou 6 expériences réalisées (gauche), et à droite les données sont exprimées sous la forme de moyenne des % de cellules Annexine V positives obtenues au cours de ces 4 ou 6 expériences indépendantes, ±SEM. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001 Mann-Whitney.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'expression ainsi qu'à la fonction des LXR dans les PDC et LPDC. Les LXR possèdent de nombreuses activités, dont une activité transcriptionnelle (permettant notamment la régulation de l'homéostasie du cholestérol et la prise en charge ou internalisation des corps apoptotiques (152)) et une activité d'interférence avec d'autres voies de signalisation (permettant notamment, la répression de l'inflammation *via* l'inhibition de la voie NF-κB (80) ou celles impliquant STAT5 (132) et Akt (198)).

Précédemment à ce travail, nous avons démontré que les PDC pouvaient internaliser les MP, et que la réponse inflammatoire induite dépendait de l'origine de ces dernières : les EMP activaient les PDC au contraire des PMP (327). Ici, nous avons démontré que les PDC et LPDC exprimaient des récepteurs LXR fonctionnels, possédant une activité transcriptionnelle (avec l'induction des gènes cibles par des agonistes). Ces récepteurs nucléaires pouvaient interférer avec la production de cytokines inflammatoires induites par des voies activant le facteur de transcription NF-κB, notamment la voie TLR7. Nous avons démontré que l'internalisation des MP était dépendante des PS qu'elles expriment à leur surface, ainsi que du récepteur aux PS BAI1 exprimé par les PDC. L'expression de BAI1 était augmentée par l'activation des LXR par les agents agonistes ou les PMP. Enfin, nous avons observé que l'internalisation de MP par les PDC pouvait induire soit la stimulation des LXR, soit celle de NF-κB de manière opposée, ce qui était lié à l'induction d'une réponse respectivement anti- ou pro-inflammatoire. Nous avons pu démontrer que ces deux facteurs se réprimaient mutuellement dans les PDC, déterminant la réponse inflammatoire induite par les MP.

Ces résultats n'excluent cependant pas la contribution de mécanismes complémentaires. Il a par exemple été démontré dans des macrophages que l'efflux du cholestérol par ABCA1/ABCG1 était nécessaire à l'effet anti-inflammatoire des LXR (169,170). Ce mécanisme passait par une privation des membranes cellulaires en cholestérol et une inhibition du recrutement de partenaires de signalisation des voies TLR (TLR2, TLR4, TLR9).

La voie TLR activée par les EMP et responsable de la réponse pro-inflammatoire reste cependant à établir dans notre étude. Pour cela, il sera intéressant de contrôler l'effet du traitement par DNAse/RNAse afin d'évaluer la contribution du contenu en acides nucléiques des MP sur la stimulation PDC. En complément, des oligonucléotides inhibiteurs des TLR7 ou TLR9 pourront être utilisés pour exclure les contributions respectives de ces derniers. Des expériences complémentaires

ont cependant révélées que les MP n'induisaient pas la production d'IFN-α par les PDC dans notre modèle (qRT-PCR), mettant en doute une stimulation des voies TLR7 ou TLR9 connues comme inducteur de la cytokine (639). Il faut évoquer d'autres voies PRR décrites pour être présentes dans les PDC, comme RAGE (400), les récepteurs de type lectines C (CLR) membranaires ou les récepteurs de type RIG-I ou RLR (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*) et de type NOD ou NLR cytoplasmique (352).

L'activation de NF-κB a été décrite comme pouvant être induite par différents dérivés protéiques (640) et lipidiques (641). Dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer la contribution de ces « types » de composés bioactifs, exprimés par les EMP sur l'activation des PDC. Pour cela, une première approche consisterait à dépléter les EMP ou PMP en protéines et évaluer la réponse inflammatoire des PDC. La conservation de la structure vésiculaire des MP devrait permettre une interaction avec les PDC similaire (engageant les mêmes voies d'internalisation) à celle des MP non modifiées. La caractérisation des constituants protéiques est rendue possible par une collaboration avec la plateforme technique FEMTO-ST et une analyse protéomique des MP après fixation sur une puce d'or à l'aide d'anticorps dirigés contre les EMP. Nous espérons ainsi déterminer des candidats protéiques susceptibles d'activer NF-κB, et vérifier leur implication fonctionnelle sur les PDC.

Il serait également intéressant de caractériser les constituants lipidiques des MP. Etant donné que ces derniers peuvent moduler l'activité des LXR (principalement les oxystérols, des acides gras insaturés ou intermédiaires de la synthèse du cholestérol), ils pourraient contribuer à la régulation croisée entre LXR et NF-κB. Une difficulté est la possibilité que les oxystérols, ligands connus de LXR, soient générés dans la PDC à partir d'un précurseur exprimé par les PMP (exemple de l'action des hydroxylases décrite ChI.II.1.i). Comme pour l'analyse des protéines, nous pourrions bénéficier de la plateforme de lipidomique de l'UMR866 de Dijon, unité participant comme la nôtre au laboratoire d'excellence LipSTIC. Les PMP après immobilisation et isolement sur puces d'or recouvertes d'anticorps anti-CD31 pourraient être analysées par lipidomique.

Comme nous l'avons observé lors de notre étude, la stimulation LXR augmente l'expression du récepteur aux PS BAI1. Ce dernier a été récemment décrit comme pouvant augmenter l'expression d'ABCA1 et l'efflux du cholestérol cellulaire, de façon indépendante de LXR (345). L'augmentation de l'efflux du cholestérol a été décrite comme régulant la réponse inflammatoire de macrophages murins (169,170). Bien que la démonstration ait été faite sur la régulation de la signalisation aux TLR, l'inhibition de la formation de radeaux lipidiques par l'appauvrissement en cholestérol des

cellules a été décrite comme réprimant la signalisation impliquant d'autres récepteurs/partenaires protéiques (198). La modulation de la réponse inflammatoire par la stimulation de BAI1, indépendamment du contenu des MP, reste cependant à démontrer.

Le récepteur Mertk (récepteur aux PS de la famille TAM) a également été décrit comme inhibant la réponse inflammatoire après stimulation par un ligand (Anticorps activateur ou GAS6) ou reconnaissance d'ectosomes (donc des MP) (494). Récemment, il a été observé que Mertk augmentait l'expression des LXR, et leur activation pouvait contribuer à l'effet anti-inflammatoire (630). Bien que Mertk ne semble pas impliqué dans l'internalisation des MP par les PDC (Figure 24), ce récepteur est exprimé par ces cellules (31% d'expression relative par rapport aux PBMC, évaluation en qRT-PCR, Figure 24A). Ce récepteur Mertk est donc potentiellement activable. Cependant, comme il a besoin d'un ligand soluble (GAS6 ou protéine S) pour faire le lien entre les PS des MP et Mertk des PDC, cet intermédiaire est peut-être manquant dans notre système. Bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation de son expression par les agonistes LXR (données non montrées), un dosage de ces protéines par technique ELISA sera nécessaire pour conclure de l'implication de ces protéines dans notre modèle expérimental.

De manière intéressante il a été observé dans des macrophages murins que la stimulation des TLR3/4 ou 9 inhibait la production de GAS6 et de la protéine S, de manière dépendante de NF-κB (642). L'activation de NF-κB induite par les EMP dans les PDC pourrait donc avoir pour effet une répression de ces protéines, limitant l'effet anti-inflammatoire des récepteurs TAM.

Il serait donc intéressant d'évaluer les effets de l'engagement de ces récepteurs (BAI1 et MERtk) sur la réponse inflammatoire des PDC, ainsi que l'activation des LXR, indépendamment de l'internalisation des MP. Cette étude pourra être étendue à d'autres récepteurs, tels que TYRO3 et AXL, ainsi que la transglutaminase 2. Cette dernière a été décrite comme régulée par LXR et impliquée dans l'internalisation des cellules apoptotiques par les macrophages (154).

De manière intéressante, nous avons observé une différence d'expression significative des PS à la surface PMP *vs* EMP. Les EMP exposent 2 fois moins de PS alors que la diminution de leur prise en charge par les PDC n'est pas significative. Ceci suggère l'implication d'autres mécanismes. De ce fait, une activation différentielle des récepteurs aux PS pourrait contribuer à la différence de réponse inflammatoire induite. Cette implication reste à étudier.

Etant donné l'implication des EMP et des PDC dans plusieurs pathologies inflammatoires comme le psoriasis, le LES et l'athérosclérose, une perspective à ce premier travail est de reproduire nos expériences à partir de MP isolées de patients. Pour cela, il sera nécessaire dans un premier temps de caractériser les MP plasmatiques des patients et de les extraire du plasma. Bien que les étapes d'ultracentrifugation à 15000*g* devraient permettre cet isolement en prévenant les contaminations par des lipoprotéines (LDL/HDL) et autres agrégats protéiques, il sera nécessaire de valider la pureté de nos échantillons. Pour cela, une étude proposait le fractionnement du plasma par chromatographie d'exclusion (406), une technique accessible au sein du laboratoire et applicable selon la disponibilité des échantillons. La caractérisation de l'origine cellulaire, ainsi que la quantification des MP, pourront être déterminées par cytométrie en flux selon les marqueurs CD31/CD41 pour les plaquettes, CD146 pour les EMP et CD235a pour les érythrocytes, comme précédemment effectué au sein du laboratoire (566,567,643). Des tests d'activation des PDC en présence des MP pourront alors être réalisés en observant la réponse inflammatoire des cellules (activation de NF-κB, implication potentielle d'IRF7 induisant la production d'IFN-type I comme précédemment décrit (407)), ainsi que le profil d'activation des LXR. La culture des PDC en présence d'agoniste LXR avec les MP permettra de démontrer une prévention potentielle de l'inflammation par les agonistes LXR. Ces données révéleraient un nouvel effet thérapeutique des agonistes LXR dans les pathologies impliquant conjointement les PDC et les MP.

L'expression fonctionnelle de LXR n'est pas restreinte aux PDC. On la retrouve aussi dans la contrepartie leucémique des PDC, (LPDC) avec une signature transcriptomique montrant une diminution de la plupart des gènes cibles de LXR dans les BPDCN. La lignée LPDC CAL-1 exprime nettement l'isoforme β de LXR, révélée par Western blot. Le traitement des LPDC par les agonistes LXR augmente l'expression des gènes cibles de LXR, ainsi que la protéine ABCA1 avec une localisation à la membrane plasmique. Alors que l'efflux du cholestérol a été associé aux effets anti-inflammatoires des LXR (169), ce mécanisme a également démontré des effets inhibiteurs de la croissance de cellules malignes (632). L'inhibition d'intermédiaires de signalisation de facteurs de croissance (comme Akt et STAT5) a été démontrée comme intervenant dans cet effet (197,198). De manière similaire, il a été observé une inhibition de la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques induite par l'IL-3, dépendante de l'efflux du cholestérol *via* ABCA1/ABCG1 et ApoE (634). Les cellules de BPDCN (LPDC) expriment fortement la chaine alpha du récepteur à l'IL-3 (CD123) et cette cytokine est un facteur de survie pour ces cellules (415). Ici, nous avons démontré une diminution de l'activité des LXR dans les BPDCN spécifiques de ces cellules (en comparaison à des

LAL/LAM et PDC primaires). L'activation des LXR par traitement agoniste diminuait la prolifération et la survie cellulaire. Ces effets étaient associés à une augmentation de l'efflux du cholestérol, une inhibition de l'activation de NF-κB et une diminution de la phosphorylation de STAT5/Akt en réponse à l'IL-3. De manière intéressante, l'augmentation de l'efflux du cholestérol (par ajout de l'accepteur ApoA1) et l'inhibition spécifique de NF-κB induisaient des effets antiprolifératifs et cytotoxiques, démontrant l'implication de ces deux mécanismes dans les effets des agonistes LXR. L'utilisation d'un modèle murin de BPDCN (par xénogreffe de LPDC) a démontré que les traitements agonistes LXR prévenaient les infiltrats LPDC spléniques et médullaires, ainsi que la cytopénie causée par la leucémie. Ces résultats démontrent donc un effet thérapeutique des agonistes LXR dans la BPDCN, impliquant au moins 2 mécanismes distincts.

Lors de cette étude, nous avons démontré un profil d'expression génique spécifique des BPDCN, montrant une diminution de l'activité des LXR. Des expériences complémentaires nous ont permis d'établir que l'IL-3 et NF-κB inhibait les LXR (Figure 25). L'inhibition des LXR par NF-κB avait été démontrée lors de notre première étude dans les PDC primaires. Etant donné la forte expression de la chaine alpha du récepteur à l'IL-3 par les LPDC, ainsi que l'activation aberrante de NF-κB dans ces cellules (422), ses deux voies pourraient être responsables du profil d'activation des LXR observé.

Nos résultats démontrent un effet anti-BPDCN des agonistes LXR par action directe sur les cellules malignes. Cet effet implique notamment une inhibition de NF-κB. Nous avons confirmé ici que l'inhibition spécifique de NF-κB induisait un effet antiprolifératif et cytotoxique sur les LPDC, en accord avec les données de la littérature (422). Bien que l'injection d'agoniste LXR montre une prévention de l'infiltration des LPDC et de la cytopénie due à la leucémie, nous n'avons pu observer qu'un gain de survie de 10% des souris (+2 jours) (Figure 27A). Ces données peuvent être dues à l'effet toxique du T0901317 déjà observé dans la littérature (208,210). Nous avons observé que les souris traitées par T0901317 présentaient des lésions hépatiques. Dans l'optique de diminuer les doses d'agonistes LXR, nous avons démontré que le traitement simultané des LPDC avec les agonistes LXR et les inhibiteurs de NF-κB induisait un effet anti-leucémique synergique *in vitro*. Cet effet pouvait être observé pour des doses non cytotoxiques des agonistes LXR (5-10 μM) et des inhibiteurs de NF-κB (Figure 27). La validation de cet effet *in vivo,* est en cours d'investigation.

Afin de mieux caractériser l'action des LXR dans les LPDC, il serait intéressant d'invalider l'expression génique de LXRα ou LXRβ (permettant de vérifier l'effet respectif des isoformes), mais aussi ABCA1/ABCG1 pour contrôler la contribution de l'efflux du cholestérol dans l'effet anti-

leucémique observé. Comme illustré ci-dessus dans le Tableau 3 (p45), l'implication respective des isoformes LXR semble différer d'un type cellulaire à l'autre. Bien que n'ayant pas pu invalider les isoformes LXR par approche CRISPR (maturation et induction de la mort des cellules transfectées), d'autres approches d'invalidation géniques restent à tester comme l'utilisation d'ARN interférants (355) permettant leur étude *in vitro*.

Il a été démontré dans un modèle murin de mélanome que l'effet thérapeutique des agonistes LXR passait par une stimulation de la production d'ApoE par les cellules stromales interagissant avec le récepteur LRP1 sur les cellules de mélanome (195). D'autre part, ApoE a été démontré comme contribuant à l'efflux du cholestérol, impliquant ABCA1 (140). Il serait donc intéressant d'évaluer la contribution d'ApoE exogène, dont la production est principalement assurée par le foie et l'intestin (138). De manière similaire, ApoA1 dont l'effet anti-leucémique a été démontré *in vitro*, pourrait contribuer à cet effet. La production d'ApoA1 est contrôlée par les LXR, principalement au niveau hépatique et intestinal.

Nous avons démontré lors de notre étude que les agonistes LXR sensibilisaient les LPDC à l'apoptose induite par TRAIL. Une sensibilité basale des LPDC avait déjà été démontrée impliquant des cellules NK ou un agoniste synthétique (441). L'utilisation d'agonistes des TRAIL-R (récepteurs aux TRAIL) ou DR (pour *Death Receptor*) en thérapeutique anti-cancéreuse a pour l'heure montré une bonne tolérance, montrant cependant un effet thérapeutique limité sur les cancers testés (442). Néanmoins l'effet de l'apoptose par la voie TRAIL dans les BPDCN n'a plus été testée depuis la publication de l'équipe de Joël Plumas (441). L'action cytotoxique des cellules NK pourrait ainsi être exploitée. De plus, l'activité cytotoxique des cellules NK contre les LPDC a été démontrée par l'utilisation d'un anticorps ciblant le CD123, responsable de l'effet de cytotoxicité médiée par les anticorps (446). Etant donné que les agonistes LXR ne modifient pas l'expression du CD123, un co-traitement est également envisageable. L'effet des agonistes LXR sur les cellules NK n'est cependant pas démontré et pourrait être un obstacle à l'activité inflammatoire des cellules.

Notre étude met donc en valeur l'effet anti-leucémique des agonistes LXR sur les BPDCN. Bien que les agonistes actuellement disponibles ne sont pas utilisables en clinique, leur intérêt thérapeutique dans plusieurs pathologies (cancers, athérosclérose, Alzheimer…) soutient le développement de nouvelles molécules, qui permettront en plus de l'utilisation en recherche fondamentale, une application thérapeutique.

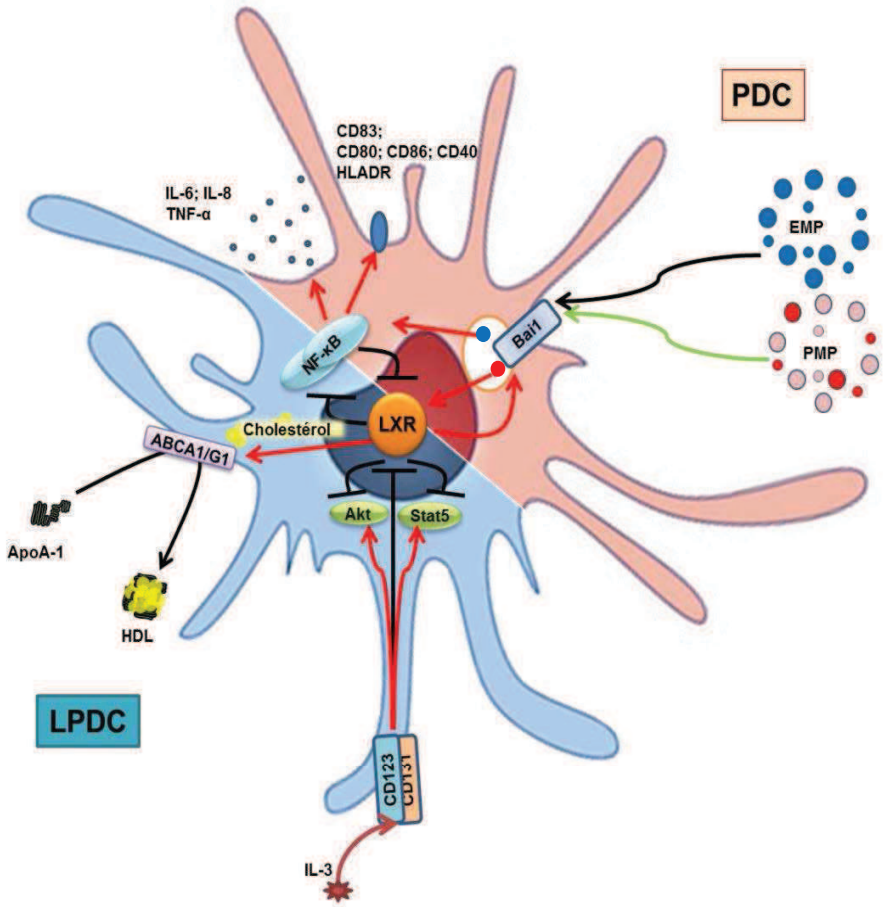


Figure 28 - Schéma récapitulatif des résultats obtenus sur la voie LXR et les PDC ou les LPDC.
Les PDC peuvent internaliser les microparticules *via* le récepteur BAI1 exprimé à leur surface. L'internalisation des EMP, connues pour exercer une activité pro-inflammatoire, entraine l'activation de NF-κB conduisant à l'inhibition de LXR et la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF) par les PDC. Les PMP, quant à elles, activent les LXR qui augmenteront l'expression de BAI1 et inhiberont la synthèse de cytokines inflammatoires et la voie NF-κB. L'activation des LXR dans les LPDC/PDC inhibe la translocation nucléaire des sous-unités de NF-κB, p50, p65 et c-Rel, ainsi que la transcription des gènes *p65* et *nfκb1* (précurseur de p50). L'inhibition de la voie NF-κB dans les LPDC est à l'origine d'un effet cytostatique et cytotoxique, comme le montre nos résultats avec l'inhibiteur de NF-κB, JSH-23. L'activation de LXR inhibe la phosphorylation de STAT5 et Akt induite par l'IL-3, cytokine augmentant la survie de ces cellules leucémiques. Enfin, LXR augmente l'efflux du cholestérol des BPDCN *via* les transporteurs ABC (ABCA1/G1) et l'accepteur ApoAI participant à l'effet cytotoxique des agonistes de la voie LXR. L'IL-3 et l'activation de NF-κB ont démontré au contraire une inhibition de l'activité des LXR, pouvant justifier de l'inhibition de leur activité dans les BPDCN.
Les agonistes LXR pourraient donc être envisagés dans la régulation de l'inflammation induite par de microparticules inflammatoires (comme les EMP impliquées dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires comme le LES, le psoriasis ou l'athérosclérose où les PDC joueraient aussi un rôle) et dans le traitement des BPDCN.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. Nature. 2008 Jul 24;454(7203):470–7.

2. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science. 2001 Nov 30;294(5548):1866–70.

3. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade. Cell. 1995 décembre;83(6):835–9.

4. Gianni M, Ponzanelli I, Mologni L, Reichert U, Rambaldi A, Terao M, et al. Retinoid-dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases. Cell Death Differ. 2000 May;7(5):447–60.

5. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? Thorax. 2000 Jul;55(7):603–13.

6. Nuclear Receptors Nomenclature Committee. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell. 1999 Apr 16;97(2):161–3.

7. Sluder AE, Maina CV. Nuclear receptors in nematodes: themes and variations. Trends Genet TIG. 2001 Apr;17(4):206–13.

8. Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. Orphan Nuclear Receptors: Shifting Endocrinology into Reverse. Science. 1999 Apr 30;284(5415):757–60.

9. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. Pharmacol Rev. 2006 Dec 1;58(4):685–704.

10. Gronemeyer H. Transcription activation by nuclear receptors. J Recept Res. 1993;13(1-4):667–91.

11. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science. 1988 May 13;240(4854):889–95.

12. Freedman LP, Luisi BF, Korszun ZR, Basavappa R, Sigler PB, Yamamoto KR. The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. Nature. 1988 Aug 11;334(6182):543–6.

13. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. J Mol Endocrinol. 1997 Dec;19(3):207–26.

14. Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 May 10;91(10):4175–9.

15. Melvin VS, Harrell C, Adelman JS, Kraus WL, Churchill M, Edwards DP. The role of the C-terminal extension (CTE) of the estrogen receptor alpha and beta DNA binding domain in DNA binding and interaction with HMGB. J Biol Chem. 2004 Apr 9;279(15):14763–71.

16. Schoenmakers E, Alen P, Verrijdt G, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, et al. Differential DNA binding by the androgen and glucocorticoid receptors involves the second Zn-finger and a C-terminal extension of the DNA-binding domains. Biochem J. 1999 Aug 1;341 (Pt 3):515–21.

17. Lee MS, Sem DS, Kliewer SA, Provencal J, Evans RM, Wright PE. NMR assignments and secondary structure of the retinoid X receptor alpha DNA-binding domain. Evidence for the novel C-terminal helix. Eur J Biochem FEBS. 1994 Sep 1;224(2):639–50.

18. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. Nature. 1995 May 18;375(6528):203–11.

19. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. Nature. 2008 Nov 20;456(7220):350–6.

20. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. Nature. 1991 Aug 8;352(6335):497–505.

21. Khorasanizadeh S, Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. Trends Biochem Sci. 2001 Jun 1;26(6):384–90.

22. Wan L-Y, Zhang Y-Q, Chen M-D, Liu C-B, Wu J-F. Relationship of Structure and Function of DNA-Binding Domain in Vitamin D Receptor. Molecules. 2015 Jul 7;20(7):12389–99.

23. Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, Spans L, Laurent M, Boonen S, et al. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding. Mol Cell Endocrinol. 2012 Jan 30;348(2):411–7.

24. Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P. Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. EMBO J. 1992 Oct;11(10):3681–94.

25. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. Annu Rev Physiol. 2007;69(1):201–20.

26. Xu J, Li Q. Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Mol Endocrinol Baltim Md. 2003 Sep;17(9):1681–92.

27. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. Cell. 2002 Jul 12;110(1):93–105.

28. Perlmann T, Umesono K, Rangarajan PN, Forman BM, Evans RM. Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. Mol Endocrinol Baltim Md. 1996 Aug;10(8):958–66.

29. Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Staub A, Pfister V, Scheuer I, Chambon P, et al. Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. Mol Endocrinol Baltim Md. 1995 Jul;9(7):860–71.

30. Delmotte MH, Tahayato A, Formstecher P, Lefebvre P. Serine 157, a retinoic acid receptor alpha residue phosphorylated by protein kinase C in vitro, is involved in RXR.RARalpha heterodimerization and transcriptional activity. J Biol Chem. 1999 Dec 31;274(53):38225–31.

31. Morgan DO. Principles of CDK regulation. Nature. 1995 Mar 9;374(6518):131–4.

32. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature. 2001 Mar 1;410(6824):37–40.

33. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 2001 Apr;22(2):153–83.

34. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. Gene. 2004 Mar 17;328:1–16.

35. Weigel NL, Zhang Y. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. J Mol Med Berl Ger. 1998 Jun;76(7):469–79.

36. Cenni null, Picard null. Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Roles for Old Players. Trends Endocrinol Metab TEM. 1999 Mar;10(2):41–6.

37. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev. 1999 Jun;20(3):358–417.

38. Mani S. Ligand-independent activation of progestin receptors in sexual receptivity. Horm Behav. 2001 Sep;40(2):183–90.

39. Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. Mol Endocrinol Baltim Md. 2000 Aug;14(8):1162–74.

40. Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. EMBO J. 1987 Nov;6(11):3333–40.

41. Barsony J, Renyi I, McKoy W. Subcellular distribution of normal and mutant vitamin D receptors in living cells. Studies with a novel fluorescent ligand. J Biol Chem. 1997 Feb 28;272(9):5774–82.

42. Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. EMBO J. 1991 Dec;10(12):3851–9.

43. Bunn CF, Neidig JA, Freidinger KE, Stankiewicz TA, Weaver BS, McGrew J, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha. Mol Endocrinol Baltim Md. 2001 Apr;15(4):512–33.

44. Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. Mol Biol Cell. 1999 Feb;10(2):471–86.

45. Prüfer K, Racz A, Lin GC, Barsony J. Dimerization with retinoid X receptors promotes nuclear localization and subnuclear targeting of vitamin D receptors. J Biol Chem. 2000 Dec 29;275(52):41114–23.

46. Watanabe Y, Tanaka T, Uchiyama Y, Takeno T, Izumi A, Yamashita H, et al. Establishment of a monoclonal antibody for human LXRalpha: Detection of LXRalpha protein expression in human macrophages. Nucl Recept. 2003 May 9;1(1):1.

47. Prüfer K, Boudreaux J. Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. J Cell Biochem. 2007 Jan 1;100(1):69–85.

48. Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. J Cell Sci. 1993 Dec;106 (Pt 4):1377–88.

49. Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Perrot-Applanat M, Milgrom E. Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiprogestins. Biochem Pharmacol. 1994 Jan 13;47(1):21–4.

50. Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. J Biol Chem. 2001 Apr 6;276(14):11237–45.

51. Haché RJ, Tse R, Reich T, Savory JG, Lefebvre YA. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. J Biol Chem. 1999 Jan 15;274(3):1432–9.

52. Prüfer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. Mol Endocrinol Baltim Md. 2002 Aug;16(8):1738–51.

53. Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. Cell. 1998 Jul 24;94(2):193–204.

54. Powers MA, Forbes DJ. Cytosolic factors in nuclear transport: what's importin? Cell. 1994 Dec 16;79(6):931–4.

55. Köhler M, Haller H, Hartmann E. Nuclear protein transport pathways. Exp Nephrol. 1999 Aug;7(4):290–4.

56. Mo J, Fang SJ, Chen W, Blobe GC. Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. J Biol Chem. 2002 Dec 27;277(52):50788–94.

57. Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell. 1995 Dec 15;83(6):851–7.

58. Charles JP, Shinoda T, Chinzei Y. Characterization and DNA-binding properties of GRF, a novel monomeric binding orphan receptor related to GCNF and betaFTZ-F1. Eur J Biochem FEBS. 1999 Nov;266(1):181–90.

59. Harding HP, Lazar MA. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. Mol Cell Biol. 1995 Sep;15(9):4791–802.

60. Giguère V, McBroom LD, Flock G. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. Mol Cell Biol. 1995 May;15(5):2517–26.

61. Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. Mol Cell Biol. 1993 Sep;13(9):5794–804.

62. Verrijdt G, Schoenmakers E, Haelens A, Peeters B, Verhoeven G, Rombauts W, et al. Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor. J Biol Chem. 2000 Apr 21;275(16):12298–305.

63. Pérez E, Bourguet W, Gronemeyer H, de Lera AR. Modulation of RXR function through ligand design. Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1821(1):57–69.

64. Olefsky JM. Nuclear Receptor Minireview Series. J Biol Chem. 2001 Oct 5;276(40):36863–4.

65. Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. Cell. 2014 Mar 27;157(1):255–66.

66. Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. Trends Pharmacol Sci. 2000 Oct;21(10):381–8.

67. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, et al. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. Nature. 2002 Feb 14;415(6873):813–7.

68. Privalsky ML. The Role of Corepressors in Transcriptional Regulation by Nuclear Hormone Receptors. Annu Rev Physiol. 2004;66(1):315–60.

69. Vaquero A, Loyola A, Reinberg D. The Constantly Changing Face of Chromatin. Sci Aging Knowl Environ. 2003 Apr 9;2003(14):re4.

70. Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson J-Å, Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. Trends Pharmacol Sci. 2012 Jul;33(7):394–404.

71. Delage-Mourroux R, Martini PG, Choi I, Kraichely DM, Hoeksema J, Katzenellenbogen BS. Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. J Biol Chem. 2000 Nov 17;275(46):35848–56.

72. White JH, Fernandes I, Mader S, Yang X-J. Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. Vitam Horm. 2004;68:123–43.

73. Jakobsson T, Venteclef N, Toresson G, Damdimopoulos AE, Ehrlund A, Lou X, et al. GPS2 Is Required for Cholesterol Efflux by Triggering Histone Demethylation, LXR Recruitment, and Coregulator Assembly at the ABCG1 Locus. Mol Cell. 2009 May 14;34(4):510–8.

74. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, et al. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. Nature. 2005 Sep 29;437(7059):759–63.

75. Huang W, Ghisletti S, Saijo K, Gandhi M, Aouadi M, Tesz GJ, et al. Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. Nature. 2011 Feb 17;470(7334):414–8.

76. Ghisletti S, Huang W, Ogawa S, Pascual G, Lin M-E, Willson TM, et al. Parallel SUMOylation-Dependent Pathways Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPARγ. Mol Cell. 2007 Jan 12;25(1):57–70.

77. Lee JH, Park SM, Kim OS, Lee CS, Woo JH, Park SJ, et al. Differential SUMOylation of LXRα and LXRβ Mediates Transrepression of STAT1 Inflammatory Signaling in IFN-γ-Stimulated Brain Astrocytes. Mol Cell. 2009 Sep 24;35(6):806–17.

78. Choi S-H, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via TLR4-dependent fluid phase uptake. Circ Res. 2009 Jun 19;104(12):1355–63.

79. Buss H, Dörrie A, Schmitz ML, Frank R, Livingstone M, Resch K, et al. Phosphorylation of serine 468 by GSK-3beta negatively regulates basal p65 NF-kappaB activity. J Biol Chem. 2004 Nov 26;279(48):49571–4.

80. Canavan M, McCarthy C, Larbi NB, Dowling J, Collins L, O'Sullivan F, et al. Activation of liver X receptor suppresses the production of the IL-12 family of cytokines by blocking nuclear translocation of NF-κBp50. Innate Immun. 2013 Sep 17;

81. Perissi V, Rosenfeld MG. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005 Jul;6(7):542–54.

82. Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? EMBO J. 2000 Mar 15;19(6):1176–9.

83. Ghisletti S, Huang W, Jepsen K, Benner C, Hardiman G, Rosenfeld MG, et al. Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. Genes Dev. 2009 Mar 15;23(6):681–93.

84. Venteclef N, Jakobsson T, Steffensen KR, Treuter E. Metabolic nuclear receptor signaling and the inflammatory acute phase response. Trends Endocrinol Metab TEM. 2011 Aug;22(8):333–43.

85. Gronemeyer H, Gustafsson J-A, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. Nat Rev Drug Discov. 2004 Nov;3(11):950–64.

86. Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. Mol Cell. 2000 Feb;5(2):289–98.

87. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. Cell. 1998 Dec 23;95(7):927–37.

88. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature. 1997 Oct 16;389(6652):753–8.

89. Pike AC, Brzozowski AM, Walton J, Hubbard RE, Thorsell AG, Li YL, et al. Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen. Struct Lond Engl 1993. 2001 Feb 7;9(2):145–53.

90. Greschik H, Flaig R, Renaud J-P, Moras D. Structural basis for the deactivation of the estrogen-related receptor gamma by diethylstilbestrol or 4-hydroxytamoxifen and determinants of selectivity. J Biol Chem. 2004 Aug 6;279(32):33639–46.

91. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. Endocr Rev. 2004 Feb;25(1):45–71.

92. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, et al. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. Diabetes. 1997 Aug;46(8):1319–27.

93. Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA. LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. Vascul Pharmacol. 2002 Apr;38(4):249–56.

94. Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, et al. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. J Biol Chem. 2002 Mar 29;277(13):11019–25.

95. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature. 1996 Oct 24;383(6602):728–31.

96. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su J-L, et al. Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway. J Biol Chem. 1997 Feb 7;272(6):3137–40.

97. Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Sidén A, Diczfalusy U, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Sep 3;93(18):9799–804.

98. Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-

hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O2 techniques in vivo and in vitro. J Biol Chem. 1997 Nov 28;272(48):30178–84.

99. Norlin M, Toll A, Björkhem I, Wikvall K. 24-hydroxycholesterol is a substrate for hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A). J Lipid Res. 2000 Oct;41(10):1629–39.

100. Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, et al. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. J Biol Chem. 1997 Oct 17;272(42):26253–61.

101. Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broomé U, Einarsson C, et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4beta-hydroxycholesterol in humans: evidence for involvement of cytochrome p450 3A4. J Biol Chem. 2001 Oct 19;276(42):38685–9.

102. Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP, Russell DW. cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. J Biol Chem. 1998 Dec 18;273(51):34316–27.

103. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):266–71.

104. Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Horoszewicz K, Bełtowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. Postępy Hig Med Dośw Online. 2007;61:736–59.

105. Spann NJ, Garmire LX, McDonald JG, Myers DS, Milne SB, Shibata N, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. Cell. 2012 Sep 28;151(1):138–52.

106. Kiss L, Chen M, Gero D, Módis K, Lacza Z, Szabó C. Effects of 7-ketocholesterol on the activity of endothelial poly(ADP-ribose) polymerase and on endothelium-dependent relaxant function. Int J Mol Med. 2006 Dec;18(6):1113–7.

107. Larsson DA, Baird S, Nyhalah JD, Yuan X-M, Li W. Oxysterol mixtures, in atheroma-relevant proportions, display synergistic and proapoptotic effects. Free Radic Biol Med. 2006 Sep 15;41(6):902–10.

108. Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Diczfalusy U, et al. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. Circulation. 1997 Feb 18;95(4):840–5.

109. Porkkala-Sarataho E, Salonen JT, Nyyssönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Ristonmaa U, et al. Long-term effects of vitamin E, vitamin C, and combined supplementation on urinary 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, serum cholesterol oxidation products, and oxidation resistance of lipids in nondepleted men. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Sep;20(9):2087–93.

110. Minden MD, Dimitroulakos J, Nohynek D, Penn LZ. Lovastatin induced control of blast cell growth in an elderly patient with acute myeloblastic leukemia. Leuk Lymphoma. 2001 Feb;40(5-6):659–62.

111. Gan X, Kaplan R, Menke JG, MacNaul K, Chen Y, Sparrow CP, et al. Dual mechanisms of ABCA1 regulation by geranylgeranyl pyrophosphate. J Biol Chem. 2001 Dec 28;276(52):48702–8.

112. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ, Evans RM. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 30;94(20):10588–93.

113. Song C, Hiipakka RA, Liao S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. Steroids. 2001 Jun;66(6):473–9.

114. Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. Cell Metab. 2007 Jan;5(1):73–9.

115. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, et al. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. J Biol Chem. 2002 Jan 18;277(3):1705–11.

116. Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, et al. Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6027–32.

117. Simons K, Ikonen E. How Cells Handle Cholesterol. Science. 2000 Dec 1;290(5497):1721–6.

118. Yasuda M, Bloor WR. LIPID CONTENT OF TUMORS. J Clin Invest. 1932 Jul;11(4):677–82.

119. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL. Regulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Cultured Human Fibroblasts COMPARISON OF CELLS FROM A NORMAL SUBJECT AND FROM A PATIENT WITH HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA. J Biol Chem. 1974 Feb 10;249(3):789–96.

120. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, et al. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. J Biol Chem. 2001 Oct 19;276(42):38378–87.

121. Zhang L, Reue K, Fong LG, Young SG, Tontonoz P. Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Nov;32(11):2541–6.

122. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Jan;76(1):333–7.

123. Chou M-Y, Hartvigsen K, Hansen LF, Fogelstrand L, Shaw PX, Boullier A, et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. J Intern Med. 2008 May;263(5):479–88.

124. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. Clin Chim Acta. 1999 Aug;286(1–2):191–205.

125. Grundy SM. Absorption and Metabolism of Dietary Cholesterol. Annu Rev Nutr. 1983;3(1):71–96.

126. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. J Clin Invest. 1998 Jun 1;101(11):2331–9.

127. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. J Clin Invest. 2002 May 1;109(9):1125–31.

128. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Feb;9(2):125–38.

129. Amemiya-Kudo M, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N, Hasty AH, Okazaki H, et al. Promoter Analysis of the Mouse Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c Gene. J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31078–85.

130. Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M. Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. J Biol Chem. 1996 Oct 25;271(43):26461–4.

131. Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS. Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c. J Biol Chem. 2002 Mar 15;277(11):9520–8.

132. Zadjali F, Santana-Farre R, Mirecki-Garrido M, Ellis E, Norstedt G, Fernandez-Perez L, et al. Liver X receptor agonist downregulates growth hormone signaling in the liver. Horm Mol Biol Clin Investig. 2011 Nov 1;8(2):471–8.

133. Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burris TP. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. J Biol Chem. 2008 Sep 26;283(39):26332–9.

134. Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Brown AJ. Endogenous 24(S),25-Epoxycholesterol Fine-tunes Acute Control of Cellular Cholesterol Homeostasis. J Biol Chem. 2008 Jan 11;283(2):700–7.

135. Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet. 1999 Aug;22(4):336–45.

136. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, et al. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. J Clin Invest. 1999 Oct;104(8):R25–31.

137. Brunham LR, Kang MH, Van Karnebeek C, Sadananda SN, Collins JA, Zhang L-H, et al. Clinical, Biochemical, and Molecular Characterization of Novel Mutations in ABCA1 in Families with Tangier Disease. JIMD Rep. 2014 Oct 12;

138. Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK. Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and E mRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocyte-macrophages. Biochemistry (Mosc). 1985 Jul 30;24(16):4450–5.

139. Zannis VI, Chroni A, Krieger M. Role of apoA-I, ABCA1, LCAT, and SR-BI in the biogenesis of HDL. J Mol Med Berl Ger. 2006 Apr;84(4):276–94.

140. Remaley AT, Stonik JA, Demosky SJ, Neufeld EB, Bocharov AV, Vishnyakova TG, et al. Apolipoprotein Specificity for Lipid Efflux by the Human ABCAI Transporter. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jan 26;280(3):818–23.

141. Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases. Neurobiol Dis. 2014 Dec;72, Part A:3–12.

142. Dove DE, Linton MF, Fazio S. ApoE-mediated cholesterol efflux from macrophages: separation of autocrine and paracrine effects. Am J Physiol - Cell Physiol. 2005 Mar 1;288(3):C586–92.

143. Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ, et al. Regulated Expression of the Apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II Gene Cluster in Murine and Human Macrophages A CRITICAL ROLE FOR NUCLEAR LIVER X RECEPTORS α AND β. J Biol Chem. 2002 Aug 30;277(35):31900–8.

144. Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. J Biol Chem. 2001 Nov 16;276(46):43018–24.

145. Desrumaux CM, Mak PA, Boisvert WA, Masson D, Stupack D, Jauhiainen M, et al. Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. J Lipid Res. 2003 Aug 1;44(8):1453–61.

146. Rinninger F, Kaiser T, Mann WA, Meyer N, Greten H, Beisiegel U. Lipoprotein lipase mediates an increase in the selective uptake of high density lipoprotein-associated cholesteryl esters by hepatic cells in culture. J Lipid Res. 1998 Jul 1;39(7):1335–48.

147. Tollefson JH, Ravnik S, Albers JJ. Isolation and characterization of a phospholipid transfer protein (LTP-II) from human plasma. J Lipid Res. 1988 Dec;29(12):1593–602.

148. Nishida HI, Nishida T. Phospholipid Transfer Protein Mediates Transfer of not Only Phosphatidylcholine but Also Cholesterol from Phosphatidylcholine-Cholesterol Vesicles to High Density Lipoproteins. J Biol Chem. 1997 Mar 14;272(11):6959–64.

149. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 29;101(26):9774–9.

150. Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. J Lipid Res. 2006 Nov;47(11):2433–43.

151. Gelissen IC, Harris M, Rye K-A, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Mar;26(3):534–40.

152. A-Gonzalez N, Bensinger SJ, Hong C, Beceiro S, Bradley MN, Zelcer N, et al. Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of LXR. Immunity. 2009 Aug 21;31(2):245–58.

153. Savage JC, Jay T, Goduni E, Quigley C, Mariani MM, Malm T, et al. Nuclear Receptors License Phagocytosis by Trem2+ Myeloid Cells in Mouse Models of Alzheimer's Disease. J Neurosci. 2015 Apr 22;35(16):6532–43.

154. Rébé C, Raveneau M, Chevriaux A, Lakomy D, Sberna A-L, Costa A, et al. Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. Circ Res. 2009 Aug 14;105(4):393–401.

155. Sarang Z, Joós G, Garabuczi É, Rühl R, Gregory CD, Szondy Z. Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity. J Immunol Baltim Md 1950. 2014 Jun 15;192(12):5730–8.

156. Hamon Y, Broccardo C, Chambenoit O, Luciani M-F, Toti F, Chaslin S, et al. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. Nat Cell Biol. 2000 Jul;2(7):399–406.

157. Christiansen-Weber TA, Voland JR, Wu Y, Ngo K, Roland BL, Nguyen S, et al. Functional loss of ABCA1 in mice causes severe placental malformation, aberrant lipid distribution, and kidney glomerulonephritis as well as high-density lipoprotein cholesterol deficiency. Am J Pathol. 2000 Sep;157(3):1017–29.

158. Hamon Y, Trompier D, Ma Z, Venegas V, Pophillat M, Mignotte V, et al. Cooperation between Engulfment Receptors: The Case of ABCA1 and MEGF10. PLoS ONE [Internet]. 2006 Dec 27 [cited 2015 Sep 16];1(1). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762421/

159. Geyeregger R, Zeyda M, Bauer W, Kriehuber E, Säemann MD, Zlabinger GJ, et al. Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. Blood. 2007 May 15;109(10):4288–95.

160. Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala RK, Westin S, et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. Cell. 2005 Sep 9;122(5):707–21.

161. Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, Negro A, et al. Tumor-mediated liver X receptor-α activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nat Med. 2010 Jan;16(1):98–105.

162. Wang Q, Ma X, Chen Y, Zhang L, Jiang M, Li X, et al. Identification of interferon-γ as a new molecular target of liver X receptor. Biochem J. 2014 Apr 15;459(2):345–54.

163. Fontaine C, Rigamonti E, Nohara A, Gervois P, Teissier E, Fruchart J-C, et al. Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. Circ Res. 2007 Jul 6;101(1):40–9.

164. Töröcsik D, Baráth M, Benko S, Széles L, Dezso B, Póliska S, et al. Activation of liver X receptor sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli. J Immunol Baltim Md 1950. 2010 May 15;184(10):5456–65.

165. Zhong L, Yang Q, Xie W, Zhou J. Liver X receptor regulates mouse GM-CSF-derived dendritic cell differentiation in vitro. Mol Immunol. 2014 Jul;60(1):32–43.

166. Feig JE, Pineda-Torra I, Sanson M, Bradley MN, Vengrenyuk Y, Bogunovic D, et al. LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. J Clin Invest. 2010 Dec;120(12):4415–24.

167. Waddington KE, Jury EC, Pineda-Torra I. Liver X receptors in immune cell function in humans. Biochem Soc Trans. 2015 Aug 1;43(4):752–7.

168. Pascual-García M, Rué L, León T, Julve J, Carbó JM, Matalonga J, et al. Reciprocal negative cross-talk between liver X receptors (LXRs) and STAT1: effects on IFN-γ-induced inflammatory responses and LXR-dependent gene expression. J Immunol Baltim Md 1950. 2013 Jun 15;190(12):6520–32.

169. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. eLife. 2015 Jul 14;4.

170. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S, et al. Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. Circulation. 2008 Oct 28;118(18):1837–47.

171. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and Toll-like Receptor Signaling Mediates Bacterial and Viral Antagonism of Cholesterol Metabolism. Mol Cell. 2003 Oct;12(4):805–16.

172. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. Circulation. 2001 Dec 18;104(25):3103–8.

173. Llaverias G, Danilo C, Mercier I, Daumer K, Capozza F, Williams TM, et al. Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer. Am J Pathol. 2011 Jan;178(1):402–12.

174. Scheinman EJ, Rostoker R, LeRoith D. Cholesterol affects gene expression of the Jun family in colon carcinoma cells using different signaling pathways. Mol Cell Endocrinol. 2013 Jul 15;374(1–2):101–7.

175. Vitols S, Norgren S, Juliusson G, Tatidis L, Luthman H. Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells. Blood. 1994 Oct 15;84(8):2689–98.

176. Tatidis L, Gruber A, Vitols S. Decreased feedback regulation of low density lipoprotein receptor activity by sterols in leukemic cells from patients with acute myelogenous leukemia. J Lipid Res. 1997 Dec;38(12):2436–45.

177. Tatidis L, Vitols S, Gruber A, Paul C, Axelson M. Cholesterol catabolism in patients with acute myelogenous leukemia and hypocholesterolemia: suppressed levels of a circulating marker for bile acid synthesis. Cancer Lett. 2001 Sep 20;170(2):169–75.

178. Li HY, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Cholesterol-modulating agents kill acute myeloid leukemia cells and sensitize them to therapeutics by blocking adaptive cholesterol responses. Blood. 2003 May 1;101(9):3628–34.

179. Stirewalt DL, Appelbaum FR, Willman CL, Zager RA, Banker DE. Mevastatin can increase toxicity in primary AMLs exposed to standard therapeutic agents, but statin efficacy is not simply associated with ras hotspot mutations or overexpression. Leuk Res. 2003 Feb;27(2):133–45.

180. Banker DE, Mayer SJ, Li HY, Willman CL, Appelbaum FR, Zager RA. Cholesterol synthesis and import contribute to protective cholesterol increments in acute myeloid leukemia cells. Blood. 2004 Sep 15;104(6):1816–24.

181. Kawata S, Yamasaki E, Nagase T, Inui Y, Ito N, Matsuda Y, et al. Effect of pravastatin on survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma. A randomized controlled trial. Br J Cancer. 2001 Apr 6;84(7):886–91.

182. Wu J, Wong WW-L, Khosravi F, Minden MD, Penn LZ. Blocking the Raf/MEK/ERK pathway sensitizes acute myelogenous leukemia cells to lovastatin-induced apoptosis. Cancer Res. 2004 Sep 15;64(18):6461–8.

183. Dimitroulakos J, Nohynek D, Backway KL, Hedley DW, Yeger H, Freedman MH, et al. Increased sensitivity of acute myeloid leukemias to lovastatin-induced apoptosis: A potential therapeutic approach. Blood. 1999 Feb 15;93(4):1308–18.

184. Thibault A, Samid D, Tompkins AC, Figg WD, Cooper MR, Hohl RJ, et al. Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1996 Mar;2(3):483–91.

185. Li Y, Li Y, Lei X, Liu L, Zhang D, Tang S. Prognostic value of statin for cancer patients: A Meta-analysis. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2015 Jul;40(7):770–81.

186. Lin C-Y, Gustafsson J-Å. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 2015 Apr;15(4):216–24.

187. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu C-P, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. Cancer Res. 2004 Nov 1;64(21):7686–9.

188. Chuu C-P, Chen R-Y, Hiipakka RA, Kokontis JM, Warner KV, Xiang J, et al. The liver X receptor agonist T0901317 acts as androgen receptor antagonist in human prostate cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 1;357(2):341–6.

189. Nguyen-Vu T, Vedin L-L, Liu K, Jonsson P, Lin JZ, Candelaria NR, et al. Liver × receptor ligands disrupt breast cancer cell proliferation through an E2F-mediated mechanism. Breast Cancer Res BCR. 2013;15(3):R51.

190. Vedin L-L, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson J-A, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. Carcinogenesis. 2009 Apr;30(4):575–9.

191. El Roz A, Bard JM, Huvelin JM, Nazih H. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the trans9, trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2013 Apr;88(4):265–72.

192. Gong H, Guo P, Zhai Y, Zhou J, Uppal H, Jarzynka MJ, et al. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. Mol Endocrinol Baltim Md. 2007 Aug;21(8):1781–90.

193. Rough JJ, Monroy MA, Yerrum S, Daly JM. Anti-proliferative effect of LXR agonist T0901317 in ovarian carcinoma cells. J Ovarian Res. 2010 May 26;3(1):13.

194. Zhang W, Jiang H, Zhang J, Zhang Y, Liu A, Zhao Y, et al. Liver X receptor activation induces apoptosis of melanoma cell through caspase pathway. Cancer Cell Int. 2014;14(1):16.

195. Pencheva N, Buss CG, Posada J, Merghoub T, Tavazoie SF. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. Cell. 2014 Feb 27;156(5):986–1001.

196. Candelaria NR, Addanki S, Zheng J, Nguyen-Vu T, Karaboga H, Dey P, et al. Antiproliferative effects and mechanisms of liver X receptor ligands in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. PloS One. 2014;9(9):e106289.

197. Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, et al. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. Cancer Discov. 2011 Oct;1(5):442–56.

198. Pommier AJC, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. Oncogene. 2010 May 6;29(18):2712–23.

199. Sanchez PV, Glantz ST, Scotland S, Kasner MT, Carroll M. Induced differentiation of acute myeloid leukemia cells by activation of retinoid X and liver X receptors. Leukemia. 2014 Apr;28(4):749–60.

200. Geyeregger R, Shehata M, Zeyda M, Kiefer FW, Stuhlmeier KM, Porpaczy E, et al. Liver X receptors interfere with cytokine-induced proliferation and cell survival in normal and leukemic lymphocytes. J Leukoc Biol. 2009 Nov;86(5):1039–48.

201. Agarwal JR, Wang Q, Tanno T, Rasheed Z, Merchant A, Ghosh N, et al. Activation of liver X receptors inhibits hedgehog signaling, clonogenic growth, and self-renewal in multiple myeloma. Mol Cancer Ther. 2014 Jul;13(7):1873–81.

202. Vedin L-L, Gustafsson J-Å, Steffensen KR. The oxysterol receptors LXRα and LXRβ suppress proliferation in the colon. Mol Carcinog. 2013 Nov;52(11):835–44.

203. Lo Sasso G, Bovenga F, Murzilli S, Salvatore L, Di Tullio G, Martelli N, et al. Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. Gastroenterology. 2013 Jun;144(7):1497–507, 1507.e1–13.

204. Derangère V, Chevriaux A, Courtaut F, Bruchard M, Berger H, Chalmin F, et al. Liver X receptor β activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. Cell Death Differ. 2014 Dec;21(12):1914–24.

205. Mehrotra A, Kaul D, Joshi K. LXR-α selectively reprogrammes cancer cells to enter into apoptosis. Mol Cell Biochem. 2011 Mar;349(1-2):41–55.

206. Hong C, Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2014 Jun;13(6):433–44.

207. Loren J, Huang Z, Laffitte BA, Molteni V. Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2009 - 2012). Expert Opin Ther Pat. 2013 Oct;23(10):1317–35.

208. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev. 2000 Nov 15;14(22):2831–8.

209. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, et al. Identification of a Nonsteroidal Liver X Receptor Agonist through Parallel Array Synthesis of Tertiary Amines. J Med Chem. 2002 mai;45(10):1963–6.

210. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plösch T, Kok T, Bloks VW, et al. Stimulation of Lipogenesis by Pharmacological Activation of the Liver X Receptor Leads to Production of Large, Triglyceride-rich Very Low Density Lipoprotein Particles. J Biol Chem. 2002 Sep 13;277(37):34182–90.

211. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro J-MA, Hammer RE, et al. Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXRα. Cell. 1998 mai;93(5):693–704.

212. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. Nat Med. 2003 Feb;9(2):213–9.

213. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norström C, Stefansson K, Hallén D, et al. Crystal structure of the heterodimeric complex of LXRalpha and RXRbeta ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. EMBO J. 2003 Sep 15;22(18):4625–33.

214. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):266.

215. Ratni H, Blum-Kaelin D, Dehmlow H, Hartman P, Jablonski P, Masciadri R, et al. Discovery of tetrahydro-cyclopenta[b]indole as selective LXRs modulator. Bioorg Med Chem Lett. 2009 Mar 15;19(6):1654–7.

216. Beaven SW, Matveyenko A, Wroblewski K, Chao L, Wilpitz D, Hsu TW, et al. Reciprocal Regulation of Hepatic and Adipose Lipogenesis by Liver X Receptors in Obesity and Insulin Resistance. Cell Metab. 2013 Jul 2;18(1):106–17.

217. Griffett K, Solt LA, El-Gendy BE-DM, Kamenecka TM, Burris TP. A Liver-Selective LXR Inverse Agonist That Suppresses Hepatic Steatosis. ACS Chem Biol. 2013 Mar 15;8(3):559–67.

218. Peng D, Hiipakka RA, Dai Q, Guo J, Reardon CA, Getz GS, et al. Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. J Pharmacol Exp Ther. 2008 Nov;327(2):332–42.

219. Lim RKV, Yu S, Cheng B, Li S, Kim N-J, Cao Y, et al. Targeted Delivery of LXR Agonist Using a Site-Specific Antibody–Drug Conjugate. Bioconjug Chem [Internet]. 2015 May 6 [cited 2015 Jul 9]; Available from: http://dx.doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00203

220. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, et al. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. Science. 2012 Mar 23;335(6075):1503–6.

221. Zhang C, Duvic M. Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with retinoids. Dermatol Ther. 2006 Oct;19(5):264–71.

222. Chao EY, Caravella JA, Watson MA, Campobasso N, Ghisletti S, Billin AN, et al. Structure-guided design of N-phenyl tertiary amines as transrepression-selective liver X receptor modulators with anti-inflammatory activity. J Med Chem. 2008 Sep 25;51(18):5758–65.

223. Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. J Lipid Res. 1993 Aug 1;34(8):1255–74.

224. Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, et al. Autoregulation of the Human Liver X Receptor α Promoter. Mol Cell Biol. 2001 Nov 15;21(22):7558–68.

225. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, et al. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 28;99(11):7604–9.

226. Quinet EM, Basso MD, Halpern AR, Yates DW, Steffan RJ, Clerin V, et al. LXR ligand lowers LDL cholesterol in primates, is lipid neutral in hamster, and reduces atherosclerosis in mouse. J Lipid Res. 2009 Dec;50(12):2358–70.

227. Katz A, Udata C, Ott E, Hickey L, Burczynski ME, Burghart P, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of single doses of LXR-623, a novel liver X-receptor agonist, in healthy participants. J Clin Pharmacol. 2009 Jun;49(6):643–9.

228. Shih DM, Shaposhnik Z, Meng Y, Rosales M, Wang X, Wu J, et al. Hyodeoxycholic acid improves HDL function and inhibits atherosclerotic lesion formation in LDLR-knockout mice. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2013 Sep;27(9):3805–17.

229. Schmitt N, Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. Curr Opin Immunol. 2015 Jun;34:130–6.

230. Mosier DE. A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. Science. 1967 Dec 22;158(3808):1573–5.

231. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. J Exp Med. 1973 May 1;137(5):1142–62.

232. Steinman RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. J Exp Med. 1979 Jan 1;149(1):1–16.

233. Nussenzweig MC, Steinman RM, Witmer MD, Gutchinov B. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982 Jan;79(1):161–5.

234. Faustman DL, Steinman RM, Gebel HM, Hauptfeld V, Davie JM, Lacy PE. Prevention of rejection of murine islet allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984 Jun;81(12):3864–8.

235. Knight SC, Hunt R, Dore C, Medawar PB. Influence of dendritic cells on tumor growth. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jul;82(13):4495–7.

236. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2003 Aug;111(7-8):675–97.

237. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood. 2010 Oct 21;116(16):e74–80.

238. Romani N, Brunner PM, Stingl G. Changing views of the role of Langerhans cells. J Invest Dermatol. 2012 Mar;132(3 Pt 2):872–81.

239. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. J Clin Invest. 1993 Dec;92(6):2587–96.

240. Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. J Immunol Baltim Md 1950. 1993 Dec 1;151(11):6535–45.

241. Haniffa M, Shin A, Bigley V, McGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. Immunity. 2012 Jul 27;37(1):60–73.

242. Said A, Weindl G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. J Immunol Res. 2015;2015:743169.

243. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. Trends Immunol. 2013 Sep;34(9):440–5.

244. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. Immunity. 2013 Feb 21;38(2):336–48.

245. Wollenberg A, Kraft S, Hanau D, Bieber T. Immunomorphological and ultrastructural characterization of Langerhans cells and a novel, inflammatory dendritic epidermal cell (IDEC) population in lesional skin of atopic eczema. J Invest Dermatol. 1996 Mar;106(3):446–53.

246. Novak N, Valenta R, Bohle B, Laffer S, Haberstok J, Kraft S, et al. FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. J Allergy Clin Immunol. 2004 May;113(5):949–57.

247. Chicha L, Jarrossay D, Manz MG. Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations. J Exp Med. 2004 Dec 6;200(11):1519–24.

248. Ishikawa F, Niiro H, Iino T, Yoshida S, Saito N, Onohara S, et al. The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. Blood. 2007 Nov 15;110(10):3591–660.

249. Lee J, Breton G, Oliveira TYK, Zhou YJ, Aljoufi A, Puhr S, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. J Exp Med. 2015 Mar 9;212(3):385–99.

250. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. Annu Rev Immunol. 2013;31:563–604.

251. Boltjes A, van Wijk F. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. Front Immunol [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2015 Aug 1];5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3978316/

252. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, et al. BIOLOGY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND PROGENITORS: Implications for Clinical Application. Annu Rev Immunol. 2003;21(1):759–806.

253. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. Nat Immunol. 2010 Jul;11(7):585–93.

254. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, et al. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. Science. 2006 Jan 6;311(5757):83–7.

255. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol. 2007 Jan 1;7(1):19–30.

256. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis. Science. 2009 Apr 17;324(5925):392–7.

257. Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, et al. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. Blood. 2000 Aug 1;96(3):878–84.

258. Marroquin CE, Westwood JA, Lapointe R, Mixon A, Wunderlich JR, Caron D, et al. Mobilization of dendritic cell precursors in patients with cancer by flt3 ligand allows the generation of higher yields of cultured dendritic cells. J Immunother Hagerstown Md 1997. 2002 Jun;25(3):278–88.

259. Morse MA, Nair S, Fernandez-Casal M, Deng Y, St Peter M, Williams R, et al. Preoperative mobilization of circulating dendritic cells by Flt3 ligand administration to patients with metastatic colon cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2000 Dec 1;18(23):3883–93.

260. Poulin LF, Reyal Y, Uronen-Hansson H, Schraml BU, Sancho D, Murphy KM, et al. DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. Blood. 2012 Jun 21;119(25):6052–62.

261. Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen J-L, et al. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. J Exp Med. 2010 Jun 7;207(6):1261–71.

262. Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, Wang X-N, Dickinson R, McGovern N, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. J Exp Med. 2011 Feb 14;208(2):227–34.

263. Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, Reynard LN, Hussain R, Haniffa M, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. Blood. 2011 Sep 8;118(10):2656–8.

264. Hambleton S, Salem S, Bustamante J, Bigley V, Boisson-Dupuis S, Azevedo J, et al. IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency. N Engl J Med. 2011 Jul 14;365(2):127–38.

265. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. Immunology. 2013 Sep;140(1):22–30.

266. Ahn JH, Lee Y, Jeon C, Lee S-J, Lee B-H, Choi KD, et al. Identification of the genes differentially expressed in human dendritic cell subsets by cDNA subtraction and microarray analysis. Blood. 2002 Sep 1;100(5):1742–54.

267. Allman D, Dalod M, Asselin-Paturel C, Delale T, Robbins SH, Trinchieri G, et al. Ikaros is required for plasmacytoid dendritic cell differentiation. Blood. 2006 Dec 15;108(13):4025–34.

268. Goldman FD, Gurel Z, Al-Zubeidi D, Fried AJ, Icardi M, Song C, et al. Congenital pancytopenia and absence of B lymphocytes in a neonate with a mutation in the Ikaros gene. Pediatr Blood Cancer. 2012 Apr;58(4):591–7.

269. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 Inhibit Development of Cd34+ Stem Cells into Predendritic Cell (Pre-Dc)2 but Not into Pre-Dc1 Evidence for a Lymphoid Origin of Pre-Dc2. J Exp Med. 2000 Dec 18;192(12):1775–84.

270. Hacker C, Kirsch RD, Ju X-S, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C, et al. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. Nat Immunol. 2003 Apr;4(4):380–6.

271. Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, et al. Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. Cell. 2008 Oct 3;135(1):37–48.

272. Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B. Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. Immunity. 2010 Dec 14;33(6):905–16.

273. Jackson JT, Hu Y, Liu R, Masson F, D'Amico A, Carotta S, et al. Id2 expression delineates differential checkpoints in the genetic program of CD8α $^{+}$ and CD103 $^{+}$ dendritic cell lineages: Differentiation of dendritic cell subsets. EMBO J. 2011 Jul 6;30(13):2690–704.

274. Rönnblomo L, Ramstedt U, Alm GV. Properties of human natural interferon-producing cells stimulated by tumor cell lines. Eur J Immunol. 1983 Jan 1;13(6):471–6.

275. Fitzgerald-Bocarsly P, Feldman M, Mendelsohn M, Curl S, Lopez C. Human mononuclear cells which produce interferon-alpha during NK(HSV-FS) assays are HLA-DR positive cells distinct from cytolytic natural killer effectors. J Leukoc Biol. 1988 Apr;43(4):323–34.

276. Sandberg K, Eloranta ML, Johannisson A, Alm GV. Flow cytometric analysis of natural interferon-alpha producing cells. Scand J Immunol. 1991 Nov;34(5):565–76.

277. Starr SE, Bandyopadhyay S, Shanmugam V, Hassan N, Douglas S, Jackson SJ, et al. Morphological and functional differences between HLA-DR+ peripheral blood dendritic cells and HLA-DR+ IFN-alpha producing cells. Adv Exp Med Biol. 1993;329:173–8.

278. Lennert K, Remmele W. [Measurement of the cell nucleus in the lymph node cells of man. II. Reticulum cells and endothelial cells]. Acta Haematol. 1958 Nov;20(5):301–17.

279. Facchetti F, De Wolf-Peeters C, Kennes C, Rossi G, De Vos R, van den Oord JJ, et al. Leukemia-associated lymph node infiltrates of plasmacytoid monocytes (so-called

plasmacytoid T-cells). Evidence for two distinct histological and immunophenotypical patterns. Am J Surg Pathol. 1990 Feb;14(2):101–12.

280. Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. Am J Pathol. 1988 Oct;133(1):15–21.

281. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. J Exp Med. 1997 Mar 17;185(6):1101–11.

282. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med. 1999 Aug;5(8):919–23.

283. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science. 1999;284(5421):1835–7.

284. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, et al. Flt3-Ligand and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilize Distinct Human Dendritic Cell Subsets In Vivo. J Immunol. 2000 Jul 1;165(1):566–72.

285. Bendriss-Vermare N, Barthélémy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, et al. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. J Clin Invest. 2001 Apr;107(7):835–44.

286. Umemoto E, Otani K, Ikeno T, Verjan Garcia N, Hayasaka H, Bai Z, et al. Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. J Immunol Baltim Md 1950. 2012 Jul 1;189(1):191–9.

287. de Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart MAM, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. J Exp Med. 2004 Jul 5;200(1):89–98.

288. Woltman AM, de Fijter JW, Zuidwijk K, Vlug AG, Bajema IM, van der Kooij SW, et al. Quantification of dendritic cell subsets in human renal tissue under normal and pathological conditions. Kidney Int. 2007 May;71(10):1001–8.

289. Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, et al. Characterization of Myeloid and Plasmacytoid Dendritic Cells in Human Lung. J Immunol. 2006 Dec 1;177(11):7784–93.

290. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. Annu Rev Immunol. 2008;26(1):293–316.

291. Yrlid U, Cerovic V, Milling S, Jenkins CD, Zhang J, Crocker PR, et al. Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. J Immunol Baltim Md 1950. 2006 Nov 1;177(9):6115–21.

292. Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2001 Oct 15;194(8):1171–8.

293. Diacovo TG, Blasius AL, Mak TW, Cella M, Colonna M. Adhesive mechanisms governing interferon-producing cell recruitment into lymph nodes. J Exp Med. 2005 Sep 5;202(5):687–96.

294. Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, Bouteiller O de, Brière F, et al. The Inducible CXCR3 Ligands Control Plasmacytoid Dendritic Cell Responsiveness to the Constitutive Chemokine Stromal Cell–derived Factor 1 (SDF-1)/CXCL12. J Exp Med. 2003 Sep 1;198(5):823–30.

295. Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Aug 15;167(4):1862–6.

296. Seth S, Oberdörfer L, Hyde R, Hoff K, Thies V, Worbs T, et al. CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. J Immunol. 2011 Mar 15;186(6):3364–72.

297. Zabel BA, Silverio AM, Butcher EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Jan 1;174(1):244–51.

298. Vermi W, Riboldi E, Wittamer V, Gentili F, Luini W, Marrelli S, et al. Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin. J Exp Med. 2005 Feb 21;201(4):509–15.

299. Albanesi C, Scarponi C, Pallotta S, Daniele R, Bosisio D, Madonna S, et al. Chemerin expression marks early psoriatic skin lesions and correlates with plasmacytoid dendritic cell recruitment. J Exp Med. 2009 Jan 16;206(1):249–58.

300. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annu Rev Immunol. 2011;29:163–83.

301. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu Y-J. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells. Blood. 2006 Mar 15;107(6):2423–31.

302. Liu Y-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol. 2005;23:275–306.

303. Gilliet M, Cao W, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. Nat Rev Immunol. 2008 août;8(8):594–606.

304. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. Nature. 2005 Apr 21;434(7036):1035–40.

305. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B Oligonucleotides Reveals Two Distinct Regulatory Pathways of Type I IFN Synthesis in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. J Immunol. 2003 May 1;170(9):4465–74.

306. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. J Exp Med. 2006 Aug 7;203(8):1999–2008.

307. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. Eur J Immunol. 2004 Jan 1;34(1):251–62.

308. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15):5598–603.

309. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens J-P, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. Blood. 2009 Aug 27;114(9):1794–802.

310. Ito T, Amakawa R, Kaisho T, Hemmi H, Tajima K, Uehira K, et al. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. J Exp Med. 2002 Jun 3;195(11):1507–12.

311. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell–specific Type II C-type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon α/β Induction. J Exp Med. 2001 Dec 17;194(12):1823–34.

312. Chappell CP, Giltiay NV, Draves KE, Chen C, Hayden-Ledbetter MS, Shlomchik MJ, et al. Targeting antigens through blood dendritic cell antigen 2 on plasmacytoid dendritic cells promotes immunologic tolerance. J Immunol Baltim Md 1950. 2014 Jun 15;192(12):5789–801.

313. Cao W, Rosen DB, Ito T, Bover L, Bao M, Watanabe G, et al. Plasmacytoid dendritic cell–specific receptor ILT7–FcεRIγ inhibits Toll-like receptor–induced interferon production. J Exp Med. 2006 Jun 12;203(6):1399–405.

314. Cao W, Zhang L, Rosen DB, Bover L, Watanabe G, Bao M, et al. BDCA2/Fc epsilon RI gamma complex signals through a novel BCR-like pathway in human plasmacytoid dendritic cells. PLoS Biol. 2007 Sep 11;5(10):e248.

315. Schroeder JT, Bieneman AP, Xiao H, Chichester KL, Vasagar K, Saini S, et al. TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Nov 1;175(9):5724–31.

316. Green DS, Lum T, Green JA. IgG-derived Fc down-regulates virus-induced plasmacytoid dendritic cell (pDC) IFNalpha production. Cytokine. 2004 Jun 7;26(5):209–16.

317. Fuchs A, Cella M, Kondo T, Colonna M. Paradoxic inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. Blood. 2005 Sep 15;106(6):2076–82.

318. Blasius AL, Cella M, Maldonado J, Takai T, Colonna M. Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. Blood. 2006 Mar 15;107(6):2474–6.

319. Ju X-S, Hacker C, Scherer B, Redecke V, Berger T, Schuler G, et al. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. Gene. 2004 Apr 28;331:159–64.

320. Cella M, Döhring C, Samaridis J, Dessing M, Brockhaus M, Lanzavecchia A, et al. A Novel Inhibitory Receptor (ILT3) Expressed on Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells Involved in Antigen Processing. J Exp Med. 1997 May 19;185(10):1743–51.

321. Vlad G, Chang C-C, Colovai AI, Berloco P, Cortesini R, Suciu-Foca N. Immunoglobulin-like transcript 3: A crucial regulator of dendritic cell function. Hum Immunol. 2009 May;70(5):340–4.

322. Grage-Griebenow E, Löseke S, Kauth M, Gehlhar K, Zawatzky R, Bufe A. Anti-BDCA-4 (neuropilin-1) antibody can suppress virus-induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells. Immunol Cell Biol. 2007 Jul;85(5):383–90.

323. Meyer-Wentrup F, Benitez-Ribas D, Tacken PJ, Punt CJA, Figdor CG, de Vries IJM, et al. Targeting DCIR on human plasmacytoid dendritic cells results in antigen presentation and inhibits IFN-alpha production. Blood. 2008 Apr 15;111(8):4245–53.

324. Dalgaard J, Beckstrøm KJ, Jahnsen FL, Brinchmann JE. Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. J Leukoc Biol. 2005 May 1;77(5):689–98.

325. Bastos-Amador P, Pérez-Cabezas B, Izquierdo-Useros N, Puertas MC, Martinez-Picado J, Pujol-Borrell R, et al. Capture of cell-derived microvesicles (exosomes and apoptotic bodies) by human plasmacytoid dendritic cells. J Leukoc Biol. 2012 May;91(5):751–8.

326. Bonnefoy F, Perruche S, Couturier M, Sedrati A, Sun Y, Tiberghien P, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a major role in apoptotic leukocyte-induced immune modulation. J Immunol Baltim Md 1950. 2011 May 15;186(10):5696–705.

327. Angelot F, Seilles E, Biichle S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J, et al. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. Haematologica. 2009 Jul 31;94(11):1502–12.

328. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. Nat Rev Immunol. 2008 May;8(5):327–36.

329. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. Immunol Rev. 2010 May;235(1):172–89.

330. Scutera S, Fraone T, Musso T, Cappello P, Rossi S, Pierobon D, et al. Survival and migration of human dendritic cells are regulated by an IFN-alpha-inducible Axl/Gas6 pathway. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Sep 1;183(5):3004–13.

331. Hilliard BA, Zizzo G, Ulas M, Linan MK, Schreiter J, Cohen PL. Increased expression of Mer tyrosine kinase in circulating dendritic cells and monocytes of lupus patients: correlations with plasma interferon activity and steroid therapy. Arthritis Res Ther. 2014 Mar 21;16(2):R76.

332. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MBA, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. Cell. 2007 Dec 14;131(6):1124–36.

333. Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, et al. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF- B activation in dendritic cells. Blood. 2007 Jan 15;109(2):653–60.

334. Koga-Yamakawa E, Murata M, Dovedi SJ, Wilkinson RW, Ota Y, Umehara H, et al. TLR7 tolerance is independent of the type I IFN pathway and leads to loss of anti-tumor efficacy in mice. Cancer Immunol Immunother CII. 2015 Oct;64(10):1229–39.

335. Umetsu SE, Lee W-L, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. Nat Immunol. 2005 May;6(5):447–54.

336. Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, et al. T cell Immunoglobulin Mucin Protein (TIM)-4 binds phosphatidylserine and mediates uptake of apoptotic cells. Immunity. 2007 Dec;27(6):927–40.

337. Ichimura T, Mou S. Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2008 May;6(5):533–8.

338. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. Nat Immunol. 2005 Dec;6(12):1245–52.

339. Nakayama M, Akiba H, Takeda K, Kojima Y, Hashiguchi M, Azuma M, et al. Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. Blood. 2009 Apr 16;113(16):3821–30.

340. Fang X-Y, Xu W-D, Pan H-F, Leng R-X, Ye D-Q. Novel insights into Tim-4 function in autoimmune diseases. Autoimmunity. 2015 May 19;48(4):189–95.

341. Meyers JH, Chakravarti S, Schlesinger D, Illes Z, Waldner H, Umetsu SE, et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1–TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. Nat Immunol. 2005 May;6(5):455–64.

342. Miyanishi M, Tada K, Koike M, Uchiyama Y, Kitamura T, Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. Nature. 2007 Nov 15;450(7168):435–9.

343. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. Nat Immunol. 2015 Aug 19;16(9):907–17.

344. Park D, Tosello-Trampont A-C, Elliott MR, Lu M, Haney LB, Ma Z, et al. BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. Nature. 2007 Nov 15;450(7168):430–4.

345. Fond AM, Lee CS, Schulman IG, Kiss RS, Ravichandran KS. Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. J Clin Invest. 2015 Jun 15;

346. Park S-Y, Jung M-Y, Kim H-J, Lee S-J, Kim S-Y, Lee B-H, et al. Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. Cell Death Differ. 2008 Jan;15(1):192–201.

347. Falkowski M, Schledzewski K, Hansen B, Goerdt S. Expression of stabilin-2, a novel fasciclin-like hyaluronan receptor protein, in murine sinusoidal endothelia, avascular tissues, and at solid/liquid interfaces. Histochem Cell Biol. 2003 Nov;120(5):361–9.

348. D'Souza S, Park S-Y, Kim I-S. Stabilin-2 acts as an engulfment receptor for the phosphatidylserine-dependent clearance of primary necrotic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2013 Mar 15;432(3):412–7.

349. Osterlund PI, Pietilä TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. J Immunol Baltim Md 1950. 2007 Sep 15;179(6):3434–42.

350. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol. 2008 Jan 1;89(1):1–47.

351. Ho HH, Ivashkiv LB. Role of STAT3 in Type I Interferon Responses NEGATIVE REGULATION OF STAT1-DEPENDENT INFLAMMATORY GENE ACTIVATION. J Biol Chem. 2006 May 19;281(20):14111–8.

352. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):805–20.

353. Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. Nature. 2005;434(7034):772–7.

354. Yasuda K, Nündel K, Watkins AA, Dhawan T, Bonegio RG, Ubellacker JM, et al. Phenotype and function of B cells and dendritic cells from interferon regulatory factor 5-deficient mice with and without a mutation in DOCK2. Int Immunol. 2013 May;25(5):295–306.

355. Steinhagen F, McFarland AP, Rodriguez LG, Tewary P, Jarret A, Savan R, et al. IRF-5 and NF-κB p50 co-regulate IFN-β and IL-6 expression in TLR9-stimulated human plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol. 2013;43(7):1896–906.

356. Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takahashi T, et al. Collaborative Action of NF-κB and p38 MAPK Is Involved in CpG DNA-Induced IFN-α and Chemokine Production in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. J Immunol. 2006 Oct 1;177(7):4841–52.

357. O'Keeffe M, Grumont RJ, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R, Vremec D, et al. Distinct roles for the NF-κB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and survival of

plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. Blood. 2005 Nov 15;106(10):3457–64.

358. Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. Eur J Immunol. 2001 Oct 1;31(10):3026–37.

359. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Röck J, Sohma Y, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. Hum Immunol. 2002 Dec;63(12):1133–48.

360. Birmachu W, Gleason RM, Bulbulian BJ, Riter CL, Vasilakos JP, Lipson KE, et al. Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR 7 agonists. BMC Immunol. 2007;8.

361. Pelka K, Latz E. IRF5, IRF8, and IRF7 in human pDCs — the good, the bad, and the insignificant? Eur J Immunol. 2013 Jul 1;43(7):1693–7.

362. Megjugorac NJ, Young HA, Amrute SB, Olshalsky SL, Fitzgerald-Bocarsly P. Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. J Leukoc Biol. 2004 Mar 1;75(3):504–14.

363. Kim Y-J, Kim SH, Mantel P, Kwon BS. Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. Eur J Immunol. 1998 Mar 1;28(3):881–90.

364. Cannons JL, Lau P, Ghumman B, DeBenedette MA, Yagita H, Okumura K, et al. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. J Immunol. 2001;167(3):1313–24.

365. Stent G, Reece JC, Baylis DC, Ivinson K, Paukovics G, Thomson M, et al. Heterogeneity of freshly isolated human tonsil dendritic cells demonstrated by intracellular markers, phagocytosis, and membrane dye transfer. Cytometry. 2002 Jul 1;48(3):167–76.

366. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CDL. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. Eur J Immunol. 1999 Sep 1;29(9):2769–78.

367. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nat Immunol. 2006 Jun;7(6):652–62.

368. Hoeffel G, Ripoche A-C, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. Immunity. 2007 Sep;27(3):481–92.

369. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, et al. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. Nat Immunol. 2008 Nov;9(11):1244–52.

370. Villadangos JA, Young L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. Immunity. 2008 Sep 19;29(3):352–61.

371. Krug A, Veeraswamy R, Pekosz A, Kanagawa O, Unanue ER, Colonna M, et al. Interferon-producing Cells Fail to Induce Proliferation of Naive T Cells but Can Promote Expansion and T Helper 1 Differentiation of Antigen-experienced Unpolarized T Cells. J Exp Med. 2003 Apr 7;197(7):899–906.

372. Salio M, Palmowski MJ, Atzberger A, Hermans IF, Cerundolo V. CpG-matured Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Are Capable of In Vivo Priming of Functional CD8 T Cell Responses to Endogenous but Not Exogenous Antigens. J Exp Med. 2004 Feb 16;199(4):567–79.

373. Fonteneau J-F, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Münz C, Liu Y-J, et al. Activation of influenza virus–specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. Blood. 2003 May 1;101(9):3520–6.

374. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sörensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. Nat Immunol. 2008 May;9(5):551–7.

375. Mouriès J, Moron G, Schlecht G, Escriou N, Dadaglio G, Leclerc C. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. Blood. 2008 Nov 1;112(9):3713–22.

376. Sapoznikov A, Fischer JAA, Zaft T, Krauthgamer R, Dzionek A, Jung S. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med. 2007 Aug 6;204(8):1923–33.

377. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. Nat Immunol. 2000 Oct;1(4):305–10.

378. Ito T, Yang M, Wang Y-H, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. J Exp Med. 2007 Jan 22;204(1):105–15.

379. Moseman EA, Liang X, Dawson AJ, Panoskaltsis-Mortari A, Krieg AM, Liu Y-J, et al. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2004 Oct 1;173(7):4433–42.

380. Martín-Gayo E, Sierra-Filardi E, Corbí AL, Toribio ML. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. Blood. 2010 Jul 1;115(26):5366–75.

381. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou D-Y, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest. 2007 Sep;117(9):2570–82.

382. Irla M, Küpfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, et al. MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. J Exp Med. 2010 Aug 30;207(9):1891–905.

383. Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. Nat Immunol. 2008 Nov;9(11):1253–60.

384. Chen W, Liang X, Peterson AJ, Munn DH, Blazar BR. The Indoleamine 2,3-Dioxygenase Pathway Is Essential for Human Plasmacytoid Dendritic Cell-Induced Adaptive T Regulatory Cell Generation. J Immunol. 2008 Oct 15;181(8):5396–404.

385. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity. 2010 Mar 26;32(3):305–15.

386. Emelyanov VV. Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell. Eur J Biochem FEBS. 2003 Apr;270(8):1599–618.

387. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Mar 4;100(5):2610–5.

388. Gottenberg J-E, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2770–5.

389. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. J Exp Med. 2005 Jul 4;202(1):135–43.

390. White MJ, McArthur K, Metcalf D, Lane RM, Cambier JC, Herold MJ, et al. Apoptotic caspases suppress mtDNA-induced STING-mediated type I IFN production. Cell. 2014 Dec 18;159(7):1549–62.

391. Rongvaux A, Jackson R, Harman CCD, Li T, West AP, de Zoete MR, et al. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. Cell. 2014 Dec 18;159(7):1563–77.

392. Granger V, de Chaisemartin L, Chollet-Martin S. La pêche miraculeuse des filets du neutrophile. médecine/sciences. 2014 May;30(5):544–9.

393. Diana J, Simoni Y, Furio L, Beaudoin L, Agerberth B, Barrat F, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. Nat Med. 2013 Jan;19(1):65–73.

394. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, et al. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. Trends Immunol. 2011 Apr;32(4):157–64.

395. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature. 2007 Oct 4;449(7162):564–9.

396. Lövgren T, Eloranta M-L, Båve U, Alm GV, Rönnblom L. Induction of interferon-α production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. Arthritis Rheum. 2004 Jun 1;50(6):1861–72.

397. Ek M, Popovic K, Harris HE, Nauclér CS, Wahren-Herlenius M. Increased extracellular levels of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Arthritis Rheum. 2006 Jul;54(7):2289–94.

398. Popovic K, Ek M, Espinosa A, Padyukov L, Harris HE, Wahren-Herlenius M, et al. Increased expression of the novel proinflammatory cytokine high mobility group box chromosomal protein 1 in skin lesions of patients with lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2005 Nov;52(11):3639–45.

399. Dumitriu IE, Baruah P, Valentinis B, Voll RE, Herrmann M, Nawroth PP, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Jun 15;174(12):7506–15.

400. Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol. 2005 Jul;35(7):2184–90.

401. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science. 1999 Jul 9;285(5425):248–51.

402. Tian J, Avalos AM, Mao S-Y, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. Nat Immunol. 2007 May;8(5):487–96.

403. Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. J Exp Med. 2005 Dec 5;202(11):1575–85.

404. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, Feigenbaum L, Town T, Ward JM, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. Immunity. 2007 Nov;27(5):801–10.

405. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, Christmann RB, Marijnissen RJ, Stawski L, et al. Proteome-wide analysis and CXCL4 as a biomarker in systemic sclerosis. N Engl J Med. 2014 Jan 30;370(5):433–43.

406. Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. J Extracell Vesicles. 2014;3.

407. Schiller M, Parcina M, Heyder P, Foermer S, Ostrop J, Leo A, et al. Induction of Type I IFN Is a Physiological Immune Reaction to Apoptotic Cell-Derived Membrane Microparticles. J Immunol. 2012 Aug 15;189(4):1747–56.

408. Daissormont ITMN, Christ A, Temmerman L, Sampedro Millares S, Seijkens T, Manca M, et al. Plasmacytoid dendritic cells protect against atherosclerosis by tuning T-cell proliferation and activity. Circ Res. 2011 Dec 9;109(12):1387–95.

409. Macritchie N, Grassia G, Sabir SR, Maddaluno M, Welsh P, Sattar N, et al. Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Nov;32(11):2569–79.

410. Döring Y, Manthey HD, Drechsler M, Lievens D, Megens RTA, Soehnlein O, et al. Auto-Antigenic Protein-DNA Complexes Stimulate Plasmacytoid Dendritic Cells to Promote Atherosclerosis. Circulation. 2012 Apr 3;125(13):1673–83.

411. Sage AP, Murphy D, Maffia P, Masters LM, Sabir SR, Baker LL, et al. MHC Class II–Restricted Antigen Presentation by Plasmacytoid Dendritic Cells Drives Proatherogenic T Cell Immunity. Circulation. 2014 Oct 14;130(16):1363–73.

412. Niessner A, Shin MS, Pryshchep O, Goronzy JJ, Chaikof EL, Weyand CM. Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque. Circulation. 2007 Oct 30;116(18):2043–52.

413. Niessner A, Sato K, Chaikof EL, Colmegna I, Goronzy JJ, Weyand CM. Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha. Circulation. 2006 Dec 5;114(23):2482–9.

414. Döring Y, Zernecke A. Plasmacytoid dendritic cells in atherosclerosis. Front Physio. 2012;3:230.

415. Chaperot L, Bendriss N, Manches O, Gressin R, Maynadie M, Trimoreau F, et al. Identification of a leukemic counterpart of the plasmacytoid dendritic cells. Blood. 2001 May 15;97(10):3210–7.

416. Adachi M, Maeda K, Takekawa M, Hinoda Y, Imai K, Sugiyama S, et al. High expression of CD56 (N-CAM) in a patient with cutaneous CD4-positive lymphoma. Am J Hematol. 1994 Dec 1;47(4):278–82.

417. Bagot M, Bouloc A, Charue D, Wechsler J, Bensussan A, Boumsell L. Do primary cutaneous non-T non-B CD4+CD56+ lymphomas belong to the myelo-monocytic lineage? J Invest Dermatol. 1998 Dec;111(6):1242–4.

418. DiGiuseppe JA, Louie DC, Williams JE, Miller DT, Griffin CA, Mann RB, et al. Blastic natural killer cell leukemia/lymphoma: a clinicopathologic study. Am J Surg Pathol. 1997 Oct;21(10):1223–30.

419. Brody JP, Allen S, Schulman P, Sun T, Chan WC, Friedman HD, et al. Acute agranular CD4-positive natural killer cell leukemia. Comprehensive clinicopathologic studies including virologic and in vitro culture with inducing agents. Cancer. 1995 May 15;75(10):2474–83.

420. Bendriss-Vermare N, Chaperot L, Peoc'h M, Vanbervliet B, Jacob M-C, Briere F, et al. In situ leukemic plasmacytoid dendritic cells pattern of chemokine receptors expression and in vitro migratory response. Leukemia. 2004 Sep;18(9):1491–8.

421. Riaz W, Zhang L, Horna P, Sokol L. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: update on molecular biology, diagnosis, and therapy. Cancer Control J Moffitt Cancer Cent. 2014 Oct;21(4):279–89.

422. Sapienza MR, Fuligni F, Agostinelli C, Tripodo C, Righi S, Laginestra MA, et al. Molecular profiling of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm reveals a unique pattern and suggests selective sensitivity to NF-kB pathway inhibition. Leukemia. 2014 Aug;28(8):1606–16.

423. Dijkman R, Doorn R van, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities. Blood. 2007 Feb 15;109(4):1720–7.

424. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. Blood. 2002 Dec 15;100(13):4512–20.

425. Comeau MR, Van der Vuurst de Vries A-R, Maliszewski CR, Galibert L. CD123bright plasmacytoid predendritic cells: progenitors undergoing cell fate conversion? J Immunol Baltim Md 1950. 2002 Jul 1;169(1):75–83.

426. Osaki Y, Yokohama A, Saito A, Tahara K, Yanagisawa K, Ogawa Y, et al. Characterization of CD56+ Dendritic-Like Cells: A Normal Counterpart of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm? PLoS ONE. 2013 Nov 29;8(11):e81722.

427. Yu H, Zhang P, Yin X, Yin Z, Shi Q, Cui Y, et al. Human BDCA2+CD123+CD56+ dendritic cells (DCs) related to blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm represent a unique myeloid DC subset. Protein Cell. 2015 Apr;6(4):297–306.

428. Bueno C, Almeida J, Lucio P, Marco J, Garcia R, de Pablos JM, et al. Incidence and characteristics of CD4(+)/HLA DRhi dendritic cell malignancies. Haematologica. 2004 Jan;89(1):58–69.

429. Garnache-Ottou F, Feuillard J, Ferrand C, Biichle S, Trimoreau F, Seilles E, et al. Extended diagnostic criteria for plasmacytoid dendritic cell leukaemia. Br J Haematol. 2009 Jun;145(5):624–36.

430. Julia F, Dalle S, Duru G, Balme B, Vergier B, Ortonne N, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms: clinico-immunohistochemical correlations in a series of 91 patients. Am J Surg Pathol. 2014 May;38(5):673–80.

431. Feuillard J, Jacob M-C, Valensi F, Maynadié M, Gressin R, Chaperot L, et al. Clinical and biologic features of CD4(+)CD56(+) malignancies. Blood. 2002 Mar 1;99(5):1556–63.

432. Piccaluga PP, Paolini S, Sapienza MR, Pileri SA. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm: is it time to redefine the standard of care? Expert Rev Hematol. 2012 Aug 1;5(4):353–5.

433. Petrella T, Bagot M, Willemze R, Beylot-Barry M, Vergier B, Delaunay M, et al. Blastic NK-cell lymphomas (agranular CD4+CD56+ hematodermic neoplasms): a review. Am J Clin Pathol. 2005 May;123(5):662–75.

434. Dietrich S, Andrulis M, Hegenbart U, Schmitt T, Bellos F, Martens UM, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasia (BPDC) in elderly patients: results of a treatment algorithm employing allogeneic stem cell transplantation with moderately reduced conditioning intensity. Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant. 2011 Aug;17(8):1250–4.

435. Pileri A, Delfino C, Grandi V, Agostinelli C, Pileri SA, Pimpinelli N. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm (BPDCN): the cutaneous sanctuary. G Ital Dermatol E Venereol Organo Uff Soc Ital Dermatol E Sifilogr. 2012 Dec;147(6):603–8.

436. Li Y, Li Z, Lin H, Chen X, Li B. Primary cutaneous blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm without extracutaneous manifestation: case report and review of the literature. Pathol Res Pract. 2011 Jan 15;207(1):55–9.

437. Sugimoto K-J, Shimada A, Yamaguchi N, Imai H, Wakabayashi M, Sekiguchi Y, et al. Sustained complete remission of a limited-stage blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm followed by a simultaneous combination of low-dose DeVIC therapy and radiation therapy: a case report and review of the literature. Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(11):2603–8.

438. Pagano L, Valentini CG, Pulsoni A, Fisogni S, Carluccio P, Mannelli F, et al. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm with leukemic presentation: an Italian multicenter study. Haematologica. 2013 Feb;98(2):239–46.

439. Bourdonnay E, Zasłona Z, Penke LRK, Speth JM, Schneider DJ, Przybranowski S, et al. Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. J Exp Med. 2015 May 4;212(5):729–42.

440. Smith CC, Wang Q, Chin C-S, Salerno S, Damon LE, Levis MJ, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. Nature. 2012 May 10;485(7397):260–3.

441. Blum A, Chaperot L, Molens J-P, Foissaud V, Plantaz D, Plumas J. Mechanisms of TRAIL-induced apoptosis in leukemic plasmacytoid dendritic cells. Exp Hematol. 2006 Dec;34(12):1655–62.

442. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. Cell Death Differ. 2014 Sep;21(9):1350–64.

443. Frankel AE, Woo JH, Ahn C, Pemmaraju N, Medeiros BC, Carraway HE, et al. Activity of SL-401, a targeted therapy directed to interleukin-3 receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm patients. Blood. 2014 Jul 17;124(3):385–92.

444. Angelot-Delettre F, Roggy A, Frankel AE, Lamarthee B, Seilles E, Biichle S, et al. In vivo and in vitro sensitivity of blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm to SL-401, an interleukin-3 receptor targeted biologic agent. Haematologica. 2015 Feb 1;100(2):223–30.

445. Nievergall E, Ramshaw HS, Yong ASM, Biondo M, Busfield SJ, Vairo G, et al. Monoclonal antibody targeting of IL-3 receptor α with CSL362 effectively depletes CML progenitor and stem cells. Blood. 2014 Feb 20;123(8):1218–28.

446. Busfield SJ, Biondo M, Wong M, Ramshaw HS, Lee EM, Ghosh S, et al. Targeting of acute myeloid leukemia in vitro and in vivo with an anti-CD123 mAb engineered for optimal ADCC. Leukemia. 2014 Nov;28(11):2213–21.

447. Gill S, Tasian SK, Ruella M, Shestova O, Li Y, Porter DL, et al. Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. Blood. 2014 Apr 10;123(15):2343–54.

448. Mardiros A, Santos CD, McDonald T, Brown CE, Wang X, Budde LE, et al. T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. Blood. 2013 Oct 31;122(18):3138–48.

449. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. Br J Haematol. 1967 May;13(3):269–88.

450. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. J Biol Chem. 1946 Nov;166(1):189–97.

451. Hougie C. The activation of platelets by plasma. Br J Haematol. 1955 Apr;1(2):213–22.

452. Webber AJ, Johnson SA. Platelet participation in blood coagulation aspects of hemostasis. Am J Pathol. 1970 Jul;60(1):19–42.

453. Crawford N. The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. Br J Haematol. 1971 Jul 1;21(1):53–69.

454. George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. Blood. 1982 Oct;60(4):834–40.

455. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, et al. Tumor shedding and coagulation. Science. 1981 May 22;212(4497):923–4.

456. Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwège V, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. J Immunol Baltim Md 1950. 1994 Oct 1;153(7):3245–55.

457. Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JWA, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. Circulation. 2002 Nov 5;106(19):2442–7.

458. Schecter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, et al. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. Circ Res. 2000 Jul 21;87(2):126–32.

459. Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. Thromb Res. 2008;122(5):604–9.

460. Bastarache JA, Fremont RD, Kropski JA, Bossert FR, Ware LB. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009 Dec;297(6):L1035–41.

461. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles. 2015;4:27066.

462. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. Pulm Circ. 2013 Apr;3(2):329–40.

463. Schiller M, Bekeredjian-Ding I, Heyder P, Blank N, Ho AD, Lorenz H-M. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. Cell Death Differ. 2008 Jan;15(1):183–91.

464. Franz S, Herrmann K, Fürnrohr BG, Führnrohr B, Sheriff A, Frey B, et al. After shrinkage apoptotic cells expose internal membrane-derived epitopes on their plasma membranes. Cell Death Differ. 2007 Apr;14(4):733–42.

465. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. J Exp Med. 1994 Apr 1;179(4):1317–30.

466. Bang C, Thum T. Exosomes: New players in cell–cell communication. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov;44(11):2060–4.

467. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim Biophys Acta. 2012 Jul;1820(7):940–8.

468. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al. 2006 Apr;Chapter 3:Unit 3.22.

469. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res. 2003 Aug 1;59(2):277–87.

470. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. Trends Cell Biol. 2009 Feb;19(2):43–51.

471. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. J Immunol Baltim Md 1950. 2001 Jun 15;166(12):7309–18.

472. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2761–6.

473. Mause SF, Weber C. Microparticles Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. Circ Res. 2010 Oct 29;107(9):1047–57.

474. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments on the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. J Thromb Haemost JTH. 2015 Nov 12;

475. Poncelet P, Robert S, Bailly N, Garnache-Ottou F, Bouriche T, Devalet B, et al. Tips and tricks for flow cytometry-based analysis and counting of microparticles. Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis. 2015 Oct;53(2):110–26.

476. Zwaal RFA, Comfurius P, Bevers EM. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. Cell Mol Life Sci CMLS. 2005 May;62(9):971–88.

477. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. Cell. 1996 Nov 1;87(3):507–17.

478. Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. J Lipid Res. 2003 Feb;44(2):233–42.

479. Freyssinet J-M, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. Thromb Res. 2010 Apr;125 Suppl 1:S46–8.

480. Shcherbina A, Remold-O'Donnell E. Role of Caspase in a Subset of Human Platelet Activation Responses. Blood. 1999 Jun 15;93(12):4222–31.

481. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. Nat Cell Biol. 2001 Apr;3(4):339–45.

482. Eguchi A, Mulya A, Lazic M, Radhakrishnan D, Berk MP, Povero D, et al. Microparticles release by adipocytes act as "find-me" signals to promote macrophage migration. PloS One. 2015;10(4):e0123110.

483. Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. J Cell Biol. 1998 Feb 9;140(3):627–36.

484. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. Blood. 2006 Sep 15;108(6):1868–76.

485. Rothmeier AS, Marchese P, Petrich BG, Furlan-Freguia C, Ginsberg MH, Ruggeri ZM, et al. Caspase-1-mediated pathway promotes generation of thromboinflammatory microparticles. J Clin Invest. 2015 Apr;125(4):1471–84.

486. Perez-Pujol S, Marker PH, Key NS. Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. Cytom Part J Int Soc Anal Cytol. 2007 Jan;71(1):38–45.

487. Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, et al. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. Proteomics. 2008 Jun;8(12):2430–46.

488. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. Thromb Haemost. 2010 May;103(5):1044–52.

489. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. Trends Pharmacol Sci. 2011 Nov;32(11):659–65.

490. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, Simon T, Boddaert J, Heeneman S, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. Circulation. 2007 Apr 24;115(16):2168–77.

491. Dasgupta SK, Abdel-Monem H, Niravath P, Le A, Bellera RV, Langlois K, et al. Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. Blood. 2009 Feb 5;113(6):1332–9.

492. Dasgupta SK, Le A, Chavakis T, Rumbaut RE, Thiagarajan P. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) mediates clearance of platelet microparticles by the endothelium. Circulation. 2012 Apr 3;125(13):1664–72.

493. Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer toB cells and monocytes: anti-inflammatory propertiesof microparticles. Eur J Immunol. 2006 Mar;36(3):648–60.

494. Eken C, Martin PJ, Sadallah S, Treves S, Schaller M, Schifferli JA. Ectosomes released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. J Biol Chem. 2010 Dec 17;285(51):39914–21.

495. Freeman SA, Grinstein S. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. Immunol Rev. 2014 Nov 1;262(1):193–215.

496. Faille D, El-Assaad F, Mitchell AJ, Alessi M-C, Chimini G, Fusai T, et al. Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. J Cell Mol Med. 2012 Aug 1;16(8):1731–8.

497. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. Thromb Haemost. 2009 Mar;101(3):439–51.

498. Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. J Biol Chem. 1988 Dec 5;263(34):18205–12.

499. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2594–604.

500. Tan KT, Lip GYH. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. Thromb Haemost. 2005 Sep;94(3):488–92.

501. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. Nat Med. 2000 Jul;6(7):769–75.

502. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. AIDS Lond Engl. 2003 Jan 3;17(1):33–42.

503. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Müller-Newen G, et al. Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. Circulation. 2010 Aug 3;122(5):495–506.

504. Basu S, Broxmeyer HE. CCR5 ligands modulate CXCL12-induced chemotaxis, adhesion, and Akt phosphorylation of human cord blood CD34+ cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2009 Dec 1;183(11):7478–88.

505. Walter DH, Rochwalsky U, Reinhold J, Seeger F, Aicher A, Urbich C, et al. Sphingosine-1-phosphate stimulates the functional capacity of progenitor cells by activation of the CXCR4-dependent signaling pathway via the S1P3 receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007 Feb;27(2):275–82.

506. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nat Cell Biol. 2008 May;10(5):619–24.

507. Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolfi E, Sandonà D, Savaglio E, et al. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. Blood. 2007 May 1;109(9):3856–64.

508. Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Möller T, Matteoli M, et al. Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Jun 1;174(11):7268–77.

509. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. Immunity. 2001 Nov;15(5):825–35.

510. Mause SF, von Hundelshausen P, Zernecke A, Koenen RR, Weber C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jul;25(7):1512–8.

511. Kim HK, Song KS, Chung J-H, Lee KR, Lee S-N. Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. Br J Haematol. 2004 Feb;124(3):376–84.

512. Brill A, Dashevsky O, Rivo J, Gozal Y, Varon D. Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization. Cardiovasc Res. 2005 Jul 1;67(1):30–8.

513. Sidhu SS, Mengistab AT, Tauscher AN, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions. Oncogene. 2004 Jan 29;23(4):956–63.

514. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Giusti I, Marchetti D, Borsotti P, Millimaggi D, et al. Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. Neoplasia N Y N. 2006 Feb;8(2):96–103.

515. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Iacono ML, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell–derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2440–8.

516. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. PloS One. 2010;5(7):e11803.

517. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. Leukemia. 2006 May;20(5):847–56.

518. Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. Science. 2004 Jan 2;303(5654):83–6.

519. Weber C, Schober A, Zernecke A. MicroRNAs in arterial remodelling, inflammation and atherosclerosis. Curr Drug Targets. 2010 Aug;11(8):950–6.

520. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. Sci Signal. 2009 Dec 8;2(100):ra81.

521. Kim S, Bae D-J, Hong M, Park S-Y, Kim I-S. The conserved histidine in epidermal growth factor-like domains of stabilin-2 modulates pH-dependent recognition of phosphatidylserine in apoptotic cells. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Jul;42(7):1154–63.

522. Biró É, Akkerman JWN, Hoek FJ, Gorter G, Pronk LM, Sturk A, et al. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. J Thromb Haemost. 2005 Dec 1;3(12):2754–63.

523. Martín-Valmaseda EM, Sánchez-Yagüe J, Hernández-Hernández A, Llanillo M. Vesiculation and changes in fluidity and lipid composition of platelet membranes after storage of sheep platelets in plasma or Seto solution. Thromb Haemost. 1998 Oct;80(4):668–76.

524. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J Clin Invest. 1998 Jul 1;102(1):136–44.

525. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, et al. Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. J Biol Chem. 2003 Aug 29;278(35):33161–8.

526. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. Blood. 2012 Oct 11;120(15):e60–72.

527. Salanova B, Choi M, Rolle S, Wellner M, Luft FC, Kettritz R. Beta2-integrins and acquired glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptors cooperate in NF-kappaB activation of human neutrophils. J Biol Chem. 2007 Sep 21;282(38):27960–9.

528. Prokopi M, Pula G, Mayr U, Devue C, Gallagher J, Xiao Q, et al. Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. Blood. 2009 Jul 16;114(3):723–32.

529. Whale TA, Wilson HL, Tikoo SK, Babiuk LA, Griebel PJ. Pivotal Advance: passively acquired membrane proteins alter the functional capacity of bovine polymorphonuclear cells. J Leukoc Biol. 2006 Sep;80(3):481–91.

530. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. Am J Pathol. 2006 Dec;169(6):2127–36.

531. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood. 2005 Sep 1;106(5):1604–11.

532. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. J Cell Biol. 2001 Aug 6;154(3):485–90.

533. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. PloS One. 2009;4(9):e7140.

534. Ray DM, Spinelli SL, Pollock SJ, Murant TI, O'Brien JJ, Blumberg N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor transcription factors are released from activated human platelets and shed in microparticles. Thromb Haemost. 2008 Jan;99(1):86–95.

535. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. PloS One. 2009;4(3):e4722.

536. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PloS One. 2008;3(11):e3694.

537. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. Blood. 2004 Oct 15;104(8):2543–8.

538. Norling LV, Dalli J. Microparticles are novel effectors of immunity. Curr Opin Pharmacol. 2013 Aug;13(4):570–5.

539. Timár CI, Lorincz AM, Csépányi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. Blood. 2013 Jan 17;121(3):510–8.

540. Hong S-W, Kim M-R, Lee E-Y, Kim JH, Kim Y-S, Jeon SG, et al. Extracellular vesicles derived from Staphylococcus aureus induce atopic dermatitis-like skin inflammation. Allergy. 2011 Mar;66(3):351–9.

541. Cloutier N, Tan S, Boudreau LH, Cramb C, Subbaiah R, Lahey L, et al. The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. EMBO Mol Med. 2013 Feb;5(2):235–49.

542. Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1α. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20684–9.

543. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, et al. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. Am Heart J. 2003 Jun;145(6):962–70.

544. Skeppholm M, Mobarrez F, Malmqvist K, Wallén H. Platelet-derived microparticles during and after acute coronary syndrome. Thromb Haemost. 2012 Jun;107(6):1122–9.

545. Garcia S, Chirinos J, Jimenez J, Del Carpio Muñoz F, Canoniero M, Jy W, et al. Phenotypic assessment of endothelial microparticles in patients with heart failure and after heart transplantation: switch from cell activation to apoptosis. J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant. 2005 Dec;24(12):2184–9.

546. Simak J, Gelderman MP, Yu H, Wright V, Baird AE. Circulating endothelial microparticles in acute ischemic stroke: a link to severity, lesion volume and outcome. J Thromb Haemost JTH. 2006 Jun;4(6):1296–302.

547. Pawelczyk M, Baj Z, Chmielewski H, Kaczorowska B, Klimek A. The influence of hyperlipidemia on platelet activity markers in patients after ischemic stroke. Cerebrovasc Dis Basel Switz. 2009;27(2):131–7.

548. van der Zee PM, Biró E, Ko Y, de Winter RJ, Hack CE, Sturk A, et al. P-selectin- and CD63-exposing platelet microparticles reflect platelet activation in peripheral arterial disease and myocardial infarction. Clin Chem. 2006 Apr;52(4):657–64.

549. Michelsen AE, Brodin E, Brosstad F, Hansen J-B. Increased level of platelet microparticles in survivors of myocardial infarction. Scand J Clin Lab Invest. 2008;68(5):386–92.

550. Chironi G, Simon A, Hugel B, Del Pino M, Gariepy J, Freyssinet J-M, et al. Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Dec;26(12):2775–80.

551. Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GYH. Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. J Thromb Haemost JTH. 2010 Nov;8(11):2358–68.

552. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien J-L, et al. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. J Hypertens. 2010 Apr;28(4):789–96.

553. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. Circulation. 1999 Jan 26;99(3):348–53.

554. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. J Am Coll Cardiol. 2007 Feb 20;49(7):772–7.

555. Rautou P-E, Leroyer AS, Ramkhelawon B, Devue C, Duflaut D, Vion A-C, et al. Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1–Dependent Monocyte Adhesion and Transendothelial Migration. Circ Res. 2011 Feb 4;108(3):335–43.

556. Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, et al. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. J Am Coll Cardiol. 2005 May 3;45(9):1467–71.

557. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut J-G, et al. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. Diabetes. 2002 Sep;51(9):2840–5.

558. Alijotas-Reig J, Palacio-Garcia C, Llurba E, Vilardell-Tarres M. Cell-derived microparticles and vascular pregnancy complications: a systematic and comprehensive review. Fertil Steril. 2013 Feb;99(2):441–9.

559. Hong Y, Eleftheriou D, Hussain AAK, Price-Kuehne FE, Savage CO, Jayne D, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. J Am Soc Nephrol JASN. 2012 Jan;23(1):49–62.

560. Erdbruegger U, Grossheim M, Hertel B, Wyss K, Kirsch T, Woywodt A, et al. Diagnostic role of endothelial microparticles in vasculitis. Rheumatol Oxf Engl. 2008 Dec;47(12):1820–5.

561. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, Mouthon L, Nusbaum P, Grunfeld J-P, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. Kidney Int. 2006 Apr;69(8):1416–23.

562. Nielsen CT, Østergaard O, Johnsen C, Jacobsen S, Heegaard NHH. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 2011 Oct;63(10):3067–77.

563. Sellam J, Proulle V, Jüngel A, Ittah M, Miceli Richard C, Gottenberg J-E, et al. Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus

erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity. Arthritis Res Ther. 2009;11(5):R156.

564. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. Thromb Haemost. 2006 Jan;95(1):94–9.

565. Boilard E, Blanco P, Nigrovic PA. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. Nat Rev Rheumatol. 2012 Sep;8(9):534–42.

566. Pelletier F, Garnache-Ottou F, Angelot F, Biichlé S, Vidal C, Humbert P, et al. Increased levels of circulating endothelial-derived microparticles and small-size platelet-derived microparticles in psoriasis. J Invest Dermatol. 2011 Jul;131(7):1573–6.

567. Pelletier F, Garnache-Ottou F, Biichlé S, Vivot A, Humbert P, Saas P, et al. Effects of anti-TNF-α agents on circulating endothelial-derived and platelet-derived microparticles in psoriasis. Exp Dermatol. 2014 Dec;23(12):924–5.

568. Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S. Platelet activation in patients with psoriasis: increased plasma levels of platelet-derived microparticles and soluble P-selectin. J Am Acad Dermatol. 2010 Apr;62(4):621–6.

569. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Böing AN, Romijn FPHTM, Kraan MC, et al. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. Arthritis Rheum. 2002 Nov;46(11):2857–66.

570. Berckmans RJ, Nieuwland R, Kraan MC, Schaap MCL, Pots D, Smeets TJM, et al. Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. Arthritis Res Ther. 2005;7(3):R536–44.

571. Knijff-Dutmer E a. J, Koerts J, Nieuwland R, Kalsbeek-Batenburg EM, van de Laar M a. FJ. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2002 Jun;46(6):1498–503.

572. Messer L, Alsaleh G, Freyssinet J-M, Zobairi F, Leray I, Gottenberg J-E, et al. Microparticle-induced release of B-lymphocyte regulators by rheumatoid synoviocytes. Arthritis Res Ther. 2009;11(2):R40.

573. Vikerfors A, Mobarrez F, Bremme K, Holmström M, Ågren A, Eelde A, et al. Studies of microparticles in patients with the antiphospholipid syndrome (APS). Lupus. 2012 Jun;21(7):802–5.

574. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost. 2004 Apr;91(4):667–73.

575. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively

correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. Crit Care Med. 2005 Nov;33(11):2540–6.

576. Mobarrez F, Nybom R, Johansson V, Hultman CM, Wallén H, Landén M, et al. Microparticles and microscopic structures in three fractions of fresh cerebrospinal fluid in schizophrenia: case report of twins. Schizophr Res. 2013 Jan;143(1):192–7.

577. Ren JG, Man QW, Zhang W, Li C, Xiong XP, Zhu JY, et al. Elevated Level of Circulating Platelet-derived Microparticles in Oral Cancer. J Dent Res. 2015 Jun 29;

578. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, et al. Tumor-Derived Tissue Factor–Bearing Microparticles Are Associated With Venous Thromboembolic Events in Malignancy. Clin Cancer Res. 2009 Nov 15;15(22):6830–40.

579. Guiducci S, Distler JHW, Jüngel A, Huscher D, Huber LC, Michel BA, et al. The relationship between plasma microparticles and disease manifestations in patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2008 Sep;58(9):2845–53.

580. Mullier F, Minet V, Bailly N, Devalet B, Douxfils J, Chatelain C, et al. Platelet microparticle generation assay: A valuable test for immune heparin-induced thrombocytopenia diagnosis. Thromb Res. 2014 Jun;133(6):1068–73.

581. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. Circulation. 1996 Feb 15;93(4):672–82.

582. Libby P, Ridker PM, Hansson GK, Leducq Transatlantic Network on Atherothrombosis. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. J Am Coll Cardiol. 2009 Dec 1;54(23):2129–38.

583. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev. 2006 Apr;86(2):515–81.

584. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. Heart Lung Circ. 2013 Jun;22(6):399–411.

585. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 May;28(5):812–9.

586. Raines EW, Ferri N. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. J Lipid Res. 2005 Jun;46(6):1081–92.

587. Aikawa E, Nahrendorf M, Sosnovik D, Lok VM, Jaffer FA, Aikawa M, et al. Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease. Circulation. 2007 Jan 23;115(3):377–86.

588. Kaartinen M, Penttilä A, Kovanen PT. Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture. Circulation. 1994 Oct;90(4):1669–78.

589. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 May;20(5):1262–75.

590. Suades R, Padró T, Vilahur G, Badimon L. Circulating and platelet-derived microparticles in human blood enhance thrombosis on atherosclerotic plaques. Thromb Haemost. 2012 Dec;108(6):1208–19.

591. Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, Smyth JV, Serracino-Inglott F, Alexander MY. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. Atherosclerosis. 2014 Jun;234(2):295–302.

592. McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. Nat Rev Cardiol. 2009 Jun;6(6):410–7.

593. Heathfield SK, Parker B, Zeef LAH, Bruce IN, Alexander MY. Certolizumab pegol attenuates the pro-inflammatory state in endothelial cells in a manner that is atheroprotective. Clin Exp Rheumatol. 2013 Apr;31(2):225–33.

594. Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. Eur Heart J. 2011 Aug;32(16):2034–41.

595. Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Jan;26(1):112–6.

596. Bernal-Mizrachi L, Jy W, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, et al. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. Int J Cardiol. 2004 Dec;97(3):439–46.

597. Finn NA, Eapen D, Manocha P, Al Kassem H, Lassegue B, Ghasemzadeh N, et al. Coronary heart disease alters intercellular communication by modifying microparticle-mediated microRNA transport. FEBS Lett. 2013 Nov 1;587(21):3456–63.

598. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. miR-223: An inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field. Biochim Biophys Acta. 2014 Jul;1842(7):1001–9.

599. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. Mol Cell. 2010 Jul 9;39(1):133–44.

600. Sarlon-Bartoli G, Bennis Y, Lacroix R, Piercecchi-Marti MD, Bartoli MA, Arnaud L, et al. Plasmatic level of leukocyte-derived microparticles is associated with unstable plaque in asymptomatic patients with high-grade carotid stenosis. J Am Coll Cardiol. 2013 Oct 15;62(16):1436–41.

601. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 May;286(5):H1910–5.

602. Tan KT, Tayebjee MH, Lynd C, Blann AD, Lip GYH. Platelet microparticles and soluble P selectin in peripheral artery disease: relationship to extent of disease and platelet activation markers. Ann Med. 2005;37(1):61–6.

603. Merten M, Pakala R, Thiagarajan P, Benedict CR. Platelet microparticles promote platelet interaction with subendothelial matrix in a glycoprotein IIb/IIIa-dependent mechanism. Circulation. 1999 May 18;99(19):2577–82.

604. Weber A, Köppen HO, Schrör K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. Thromb Res. 2000 Jun 1;98(5):461–6.

605. Fourcade O, Simon MF, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, et al. Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. Cell. 1995 Mar 24;80(6):919–27.

606. Bot M, Bot I, Lopez-Vales R, van de Lest CHA, Saulnier-Blache JS, Helms JB, et al. Atherosclerotic lesion progression changes lysophosphatidic acid homeostasis to favor its accumulation. Am J Pathol. 2010 Jun;176(6):3073–84.

607. Klose A, Zigrino P, Mauch C. Monocyte/macrophage MMP-14 modulates cell infiltration and T-cell attraction in contact dermatitis but not in murine wound healing. Am J Pathol. 2013 Mar;182(3):755–64.

608. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Lesèche G, Tedgui A, Bonardo B, et al. Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. Am J Pathol. 2007 Nov;171(5):1713–23.

609. Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, et al. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. Circ Res. 2011 Aug 19;109(5):593–606.

610. Liu M-L, Scalia R, Mehta JL, Williams KJ. Cholesterol-induced membrane microvesicles as novel carriers of damage-associated molecular patterns: mechanisms of formation, action, and detoxification. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012 Sep;32(9):2113–21.

611. Tsiantoulas D, Perkmann T, Afonyushkin T, Mangold A, Prohaska TA, Papac-Milicevic N, et al. Circulating microparticles carry oxidation-specific epitopes and are recognized by natural IgM antibodies. J Lipid Res. 2015 Feb;56(2):440–8.

612. Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. Free Radic Biol Med. 2012 Dec 1;53(11):2159–70.

613. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. Thromb Haemost. 2001 Apr;85(4):639–46.

614. Ullal AJ, Reich CF 3rd, Clowse M, Criscione-Schreiber LG, Tochacek M, Monestier M, et al. Microparticles as antigenic targets of antibodies to DNA and nucleosomes in systemic lupus erythematosus. J Autoimmun. 2011 May;36(3-4):173–80.

615. Pisetsky DS. Microparticles as autoantigens: making immune complexes big. Arthritis Rheum. 2012 Apr;64(4):958–61.

616. Nielsen CT, Østergaard O, Stener L, Iversen LV, Truedsson L, Gullstrand B, et al. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. Arthritis Rheum. 2012 Apr;64(4):1227–36.

617. Ullal AJ, Pisetsky DS. The role of microparticles in the generation of immune complexes in murine lupus. Clin Immunol Orlando Fla. 2013 Jan;146(1):1–9.

618. Sheng H, Hassanali S, Nugent C, Wen L, Hamilton-Williams E, Dias P, et al. Insulinoma-released exosomes or microparticles are immunostimulatory and can activate autoreactive T cells spontaneously developed in nonobese diabetic mice. J Immunol Baltim Md 1950. 2011 Aug 15;187(4):1591–600.

619. Distler JHW, Jüngel A, Huber LC, Seemayer CA, Reich CF, Gay RE, et al. The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblasts stimulated with immune cell microparticles. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 22;102(8):2892–7.

620. György B, Szabó TG, Turiák L, Wright M, Herczeg P, Lédeczi Z, et al. Improved flow cytometric assessment reveals distinct microvesicle (cell-derived microparticle) signatures in joint diseases. PloS One. 2012;7(11):e49726.

621. Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GFM, Coblyn JS, Weinblatt ME, et al. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. Science. 2010 Jan 29;327(5965):580–3.

622. Julich H, Willms A, Lukacs-Kornek V, Kornek M. Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker. Front Immunol. 2014;5:413.

623. Kreimer S, Belov AM, Ghiran I, Murthy SK, Frank DA, Ivanov AR. Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: lipidomics and proteomics. J Proteome Res. 2015 Jun 5;14(6):2367–84.

624. Pienimaeki-Roemer A, Kuhlmann K, Böttcher A, Konovalova T, Black A, Orsó E, et al. Lipidomic and proteomic characterization of platelet extracellular vesicle subfractions from senescent platelets. Transfusion (Paris). 2015 Mar;55(3):507–21.

625. Nomura S, Shouzu A, Taomoto K, Togane Y, Goto S, Ozaki Y, et al. Assessment of an ELISA kit for platelet-derived microparticles by joint research at many institutes in Japan. J Atheroscler Thromb. 2009;16(6):878–87.

626. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. Blood. 2011 Jan 27;117(4):e39–48.

627. Rood IM, Deegens JKJ, Merchant ML, Tamboer WPM, Wilkey DW, Wetzels JFM, et al. Comparison of three methods for isolation of urinary microvesicles to identify biomarkers of nephrotic syndrome. Kidney Int. 2010 Oct;78(8):810–6.

628. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. J Intern Med. 2008 May;263(5):528–37.

629. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, et al. Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. Exp Hematol. 2002 May;30(5):450–9.

630. Choi J-Y, Seo JY, Yoon Y-S, Lee Y-J, Kim H-S, Kang JL. Mer signaling increases the abundance of the transcription factor LXR to promote the resolution of acute sterile inflammation. Sci Signal. 2015;8(365):ra21.

631. Hong C, Duit S, Jalonen P, Out R, Scheer L, Sorrentino V, et al. The E3 ubiquitin ligase IDOL induces the degradation of the low density lipoprotein receptor family members VLDLR and ApoER2. J Biol Chem. 2010 Jun 25;285(26):19720–6.

632. El Roz A, Bard J-M, Huvelin J-M, Nazih H. LXR agonists and ABCG1-dependent cholesterol efflux in MCF-7 breast cancer cells: relation to proliferation and apoptosis. Anticancer Res. 2012 Jul;32(7):3007–13.

633. Gilis L, Lebras L, Bouafia-Sauvy F, Espinouse D, Felman P, Berger F, et al. Sequential combination of high dose methotrexate and L-asparaginase followed by allogeneic transplant: a first-line strategy for CD4+/CD56+ hematodermic neoplasm. Leuk Lymphoma. 2012 Aug;53(8):1633–7.

634. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-Binding Cassette Transporters and HDL Suppress Hematopoietic Stem Cell Proliferation. Science. 2010 Jun 25;328(5986):1689–93.

635. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Feb;9(2):125–38.

636. Singh P, Saxena R, Srinivas G, Pande G, Chattopadhyay A. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. PloS One. 2013;8(3):e58833.

637. Dagvadorj A, Kirken RA, Leiby B, Karras J, Nevalainen MT. Transcription factor signal transducer and activator of transcription 5 promotes growth of human prostate cancer cells in vivo. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008 Mar 1;14(5):1317–24.

638. Huang C, Hu X, Wang L, Lü S, Cheng H, Song X, et al. Bortezomib suppresses the growth of leukemia cells with Notch1 overexpression in vivo and in vitro. Cancer Chemother Pharmacol. 2012 Dec;70(6):801–9.

639. Puig M, Tosh KW, Schramm LM, Grajkowska LT, Kirschman KD, Tami C, et al. TLR9 and TLR7 agonists mediate distinct type I IFN responses in humans and nonhuman primates in vitro and in vivo. J Leukoc Biol. 2012 Jan 1;91(1):147–58.

640. Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-κB Signaling System. Cytokine Growth Factor Rev. 2008;19(3-4):187–97.

641. Barma P, Bhattacharya S, Bhattacharya A, Kundu R, Dasgupta S, Biswas A, et al. Lipid induced overexpression of NF-kappaB in skeletal muscle cells is linked to insulin resistance. Biochim Biophys Acta. 2009 Mar;1792(3):190–200.

642. Deng T, Zhang Y, Chen Q, Yan K, Han D. Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and ProS expression facilitates inflammatory cytokine production in mouse macrophages. Immunology. 2012 Jan 1;135(1):40–50.

643. Laresche C, Pelletier F, Garnache-Ottou F, Lihoreau T, Biichlé S, Mourey G, et al. Increased Levels of Circulating Microparticles are Associated With Increased Procoagulant Activity in Patients with Cutaneous Malignant Melanoma. J Invest Dermatol [Internet]. 2013 Jun 28 [cited 2013 Jul 23]; Available from: http://www.nature.com/jid/journal/vaop/naam/pdf/jid2013288a.pdf