



HAL
open science

Rôle des facteurs de transcription NOR1 et TLE1 dans les macrophages alternatifs humains

Fédérica de Paoli

► **To cite this version:**

Fédérica de Paoli. Rôle des facteurs de transcription NOR1 et TLE1 dans les macrophages alternatifs humains. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S006 . tel-01257811

HAL Id: tel-01257811

<https://theses.hal.science/tel-01257811>

Submitted on 18 Jan 2016

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

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

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
FACULTE DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

Thèse

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

**Rôle des facteurs de transcription NOR1 et
TLE1 dans les macrophages alternatifs
humains**

Presentée et soutenue publiquement par :

Federica DE PAOLI

Le 25 Février 2015

Directrice de thèse: Dr Giulia CHINETTI-GBAGUIDI

Jury:

Pr. Bart STAELS, Président

Dr. Laurent YVAN-CHARVET, Rapporteur

Pr. David MASSON, Rapporteur

Dr. Philippe LEFEBVRE, Examineur

Tout est une question d'équilibre

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Bart Staels, qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et me fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance de thèse. Je l'en remercie sincèrement.

Je souhaite adresser ma plus profonde gratitude à ma directrice de thèse Madame le Docteur Giulia Chinetti-Gbaguidi. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée depuis le premier instant. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour votre rigueur scientifique, vos précieux conseils, votre soutien et infinie disponibilité ainsi que pour votre présence constante qui n'a jamais cessée malgré les changements logistiques intervenus dans les derniers temps. Je vous serai toujours reconnaissante pour l'énorme bagage scientifique que vous m'avez transmis. *E' stato un onore lavorare con lei e non potrò mai ringraziarla a sufficienza per quanto ho imparato al suo fianco in questi anni.*

Messieurs le Docteur Laurent Yvan-Charvet et le Professeur David Masson, vous me faites l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et mon profond respect.

Monsieur le Docteur Philippe Lefebvre, je suis honorée de votre présence dans mon jury de thèse en qualité d'examineur. Recevez ici mes sincères remerciements.

Je remercie Jérôme pour sa disponibilité et son professionnalisme, j'ai apprécié travailler avec toi au cours des ces années.

Je tiens à exprimer un immense merci à tous les gens du labo, de Pasteur à J&K pour leur sympathie. Une mention spéciale à Christian pour les tonnes de gel shift et de plasmides clonés, les bons conseils, les petites blagues et pour m'avoir aidée à relativiser les choses :-), Corinne C pour ta rigueur en salle de culture, Bruno pour les milliards de Q-PCR, à Sophie et Yasmine, correctrices officielles de la forme de ce manuscrit, à Mehdi, mon collègue « fou » de bureau, à Benoit, Jonathan, Steve, Denis, Gael, Stephane, Corinne R, Isa et Barbara pour vos suggestions, vos sourires et votre soutien. Je l'ai beaucoup apprécié !

Un super grand merci (GRAZIE) à Mél (!!), Loïc et Geoffrey pour vos blagues, le grand aide et pour avoir fait preuve de courage à tolérer mon sacré caractère, heureusement que « par fois » vous étiez la:-P

Un immense merci à ceux que j'ai croisé dans les couloirs de ce labo et que avec le temps sont devenus mes amis dans cette vie française : Yoanna, Vera, Morgane et Michal.

LN, merci pour nos entraînements sportifs, divisés entre la course à pied dans les soirées glaciales d'hiver et les bains dans l'eau chlorée des piscines lilloises pour déteindre les nerves.

Manju, it was a big chance to meet you! Thanks a lot for having initiated me to indian food, by the way I still prefer when you add sugar instead of spices :-P

Merci à Marta et Clement pour avoir rendu les années lilloises amusantes, riches en rencontre et folles à la juste mesure.

Un grazie di cuore alla mia famiglia per non avermi mai fatto mancare supporto e calore in questi anni lontana da casa.

Grazie grazie grazie ai miei amici di sempre che nonostante le "interruzioni di segnale" di skype e whatsapp mi sono sempre stati vicini, mi hanno motivata, compresa e regalato una risata: Manu, Sara-Clara, Davide, Roby, Melissa, Anita, Claudia, Fiocco.

Comment oublier Sami et Vale, parce que nous sommes « tous dans le même bateau ». Sami merci pour m'avoir accompagnée dans mes délires comme le saut à l'élastique ! La prochaine épreuve : saut en parachute ! *Vale cosa fare io senza di te ? Sei la miglior compagna di avventura ed Amica che avrei mai potuto desiderare!! Grazie di cuore per tutto :-)*

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications originales

De Paoli F, Eeckhoutte J, Copin C, Vanhoutte J, Duhem C, Derudas B, Dubois-Chevalier J, Colin S, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype. *Atherosclerosis* 2015 (en revision favorable).

Vinod M, Chennamsetty I, Colin S, Belloy L, **De Paoli F**, Schaidler H, Graier WF, Frank S, Kratky D, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G, Kostner GM. miR-206 controls LXR α expression and promotes LXR-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841(6): 827-35.

Article de synthèse

De Paoli F, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circulation Journal* 2014; 78(8):1775-81.

COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES

De Paoli F, Eeckhoutte J, Copin C, Vanhoutte J, Derudas B, Chevalier J, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Pattou F, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. The Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates markers of the M2 phenotype. *10ème congrès de la NSFA (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose), Biarritz, 19-21 juin 2014*. Communication affichée, obtention du prix poster.

De Paoli F, Eeckhoutte J, Copin C, Vanhoutte J, Derudas B, Chevalier J, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Pattou F, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Control of macrophage polarization by NOR1. *Journée Think Tank 2014, Lille, 26 juin 2014*. Communication orale

De Paoli F, Copin C, Vanhoutte J, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. The neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (NOR1) is induced in human alternative macrophages and controls the expression of alternative polarization markers. *81ème congrès de l'EAS (European Atherosclerosis Society), Lion, 2-5 juin 2013*. Communication affichée

De Paoli F, Copin C, Vanhoutte J, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. The neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (NOR1) is induced in human alternative macrophages and controls the expression of alternative polarization markers. *FEBS Advanced Lecture Course, Spetses summer school on nuclear receptor signalling in physiology and disease, Ile de Spetses (Grece), 25-30 aout 2013*. Communication affichée

De Paoli F, Copin C, Vanhoutte J, Zawadzki C, Jude B, Haulon S, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. The neuron-derived orphan nuclear receptor 1 (NOR1) is induced in human alternative macrophages and controls the expression of alternative polarization markers. *12^{ème} journée André Verbert, Lille, 11 septembre 2012*. Communication affichée

FINANCEMENT

Bourse doctorale de l'Université Lille 2 accordée pour les 3 années de thèse

FORMATIONS SUIVIES

Bien utiliser les indicateurs bibliométriques en biologie-santé (facteur d'impact, h-index, sigaps) du 16 octobre 2014

Doc'Emploi du 13 novembre 2014

Guided Microarray data analysis (Partek) du 12 septembre 2013

Séminaire Athérosclérose: Nutrition et prévention du risque cardiovasculaire, 20-22 septembre 2012

RESUME

Etude de l'expression et du rôle de NOR1 dans les macrophages alternatifs humains

NOR1 (NR4A3) avec deux autres membres, Nurr1 et Nur77, fait partie de la famille des récepteurs nucléaires NR4A. Les trois récepteurs sont exprimés par les macrophages au sein de la lésion d'athérosclérose humaine. Cependant, l'expression et le rôle de NOR1 dans les macrophages alternatifs n'ont pas encore été étudiés. En utilisant le modèle *in vitro* de macrophages primaires alternatifs humains polarisés en présence d'IL-4, nous avons démontré que l'expression de NOR1 est induite dans les macrophages M2, une régulation pas observée chez la souris. D'ailleurs, l'expression de NOR1 est plus importante dans les zones de la lésion athérosclérotique humaine enrichies en macrophages alternatifs CD68⁺MR⁺. En utilisant l'approche de diminution de l'expression de NOR1 par un siRNA spécifique, nous démontrons que l'expression de certains marqueurs de la polarisation alternative tels que *Mannose Receptor (MR)*, *Interleukin-1 receptor antagonist (IL1Ra)*, *CD200 receptor (CD200R)*, *coagulation factor XIII A1 polypeptide (F13A1)*, *interleukin 10 (IL10)* et *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ)* est diminuée. Des analyses bioinformatiques ont identifié les gènes F13A1, IL-1Ra, IL-10 et la *matrix metalloproteinase 9 (MMP9)*, comme étant des cibles potentielles de NOR1 dans les macrophages alternatifs humains. De plus, l'expression et l'activité enzymatique de la MMP9 sont induites suite au *silencing* de NOR1, une régulation confirmée par l'approche de surexpression de NOR1 par infection adénovirale. Ces données identifient NOR1 comme un facteur de transcription présent dans les macrophages alternatifs humains capable de modifier leur phénotype alternatif.

Etude de l'expression et des fonctions potentielles de TLE1 dans les macrophages alternatifs

TLE1, appartenant à la grande famille appelée « Groucho » chez la Drosophile, est connu pour être un répresseur de la transcription incapable de se fixer directement à l'ADN et que par conséquent agit après interaction avec d'autres facteurs de transcription. Aucune donnée n'est disponible quant à l'expression ni aux fonctions de TLE1 dans les macrophages humains. Nos résultats montrent que TLE1 est parmi les facteurs de transcription les plus exprimés dans les macrophages alternatifs humains comparativement aux macrophages non polarisés, une induction aussi observée dans les macrophages de souris. Nous avons aussi montré que TLE1 est fortement exprimé dans les zones enrichies en macrophages M2 au sein de la plaque athérosclérotique humaine ainsi que dans les macrophages à phénotype mixte qui infiltrent le tissu adipeux chez les sujets obèses. Nous avons suggéré un rôle potentiellement anti-inflammatoire pour TLE1. En fait, lorsque son expression est diminuée par une approche de siRNA, l'expression de certains marqueurs de la polarisation alternative (tels que IL-10 et IL1Ra) diminue tandis que l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires augmente en réponse à la stimulation par le LPS. Nous avons ensuite caractérisé l'expression génique de TLE1 dans les patients obèses avec ou sans diabète et nous montrons que l'expression de TLE1 varie selon le statut métabolique du donneur. L'ensemble de ces résultats préliminaires, mettant en évidence TLE1 comme un nouvel acteur d'intérêt dans les macrophages, mérite d'être confirmé et complété par des nouvelles expériences.

ABSTRACT

The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is highly expressed in human alternative macrophages where it induces the expression of markers of the M2 phenotype.

The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1), together with Nur77 and Nurr1, is a member of the NR4A orphan nuclear receptor family expressed in human atherosclerotic lesion macrophages. However, the expression and functions of NOR1 in human alternative macrophages have not been studied yet. Using an *in vitro* model of IL-4 polarized primary human alternative macrophages we demonstrate that NOR1 expression increased in alternative M2 macrophages compared to unpolarized macrophages in humans but not in mice, likely via STAT6 binding to a response element in the human NOR1 promoter, as demonstrated by electrophoretic mobility shift assays.

Moreover, NOR1 expression is also more abundant in CD68⁺MR⁺ alternative macrophage-enriched areas of human atherosclerotic plaques *in vivo*. Silencing NOR1 expression in human alternative macrophages decreases the expression of a panel of M2 markers such as the *Mannose Receptor (MR)*, *Interleukin-1 receptor antagonist (IL1Ra)*, *CD200 receptor (CD200R)*, *coagulation factor XIII A1 polypeptide (F13A1)*, *Interleukin 10 (IL10)* and the *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ)*. Bioinformatical analysis identified F13A1, IL-1Ra, IL-10 and the *Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9)* as potential target genes of NOR1 in human alternative macrophages. Moreover, expression and enzymatic activity of MMP9 are induced by NOR1 silencing in M2 macrophages, a regulation confirmed in NOR1 gain of function experiments. These data identify NOR1 among the transcription factors induced during alternative differentiation of human macrophages and demonstrate that NOR1 modifies the alternative macrophage phenotype.

Study of the expression and potential functions of TLE1 in human alternative macrophages.

TLE1 is a member of the Groucho family and it is mainly described as a transcriptional co-repressor. Although lacking DNA binding activity of its own, this protein is recruited to gene promoters through interaction with other factors. No data are available regarding the expression or the role of TLE1 in human macrophages. Our results show that TLE1 is among the highest expressed transcription factors in human alternative macrophages, a regulation verified also in murine macrophages. Histological analysis showed that TLE1 expression in human carotid atherosclerotic lesions *in vivo* co-localizes with the macrophage marker CD68 and the alternative marker MR. Q-PCR analysis of macrophage-enriched areas isolated by LCM showed that the mRNA levels of TLE1 are higher in zones of alternative CD68⁺MR⁺ macrophages compared to zones enriched in CD68⁺MR⁻ macrophages. Moreover, we have shown that TLE1 expression is higher in adipose tissue macrophages compared to resting macrophages differentiated from blood monocytes of the same obese subjects. We have suggested a potential anti-inflammatory role for TLE1; indeed, when its expression is decreased by a siRNA approach, the expression of some alternative markers (IL-10 and IL-1Ra) is decreased while the expression of pro-inflammatory genes (TNF α , IL-6 and CCL3) is increased in response to LPS. Finally, we have characterised the mRNA expression of TLE1 in obese patients affected or not by diabetes and we have shown that TLE1 expression is influenced by the metabolic state of the patients. These preliminary data, identifying TLE1 as a novel potential actor in macrophages, need to be confirmed and completed by novel experiments.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES PUBLICATIONS	5
RESUME	7
ABSTRACT	8
LISTE DES FIGURES	13
LISTE DES ABBREVIATIONS	14
AVANT PROPOS	17
INTRODUCTION	
1. L'ATHEROSCLEROSE	19
1.1 Une maladie chronique de la paroi artérielle : définition	19
1.2 Structure de la paroi vasculaire	19
1.2.1 l'Intima.....	21
1.2.2 La media	21
1.2.3 L'adventice	21
1.3 Accumulation et modification des lipoprotéines dans l'intima artérielle	22
1.4 L'activation des cellules endothéliales	22
1.5 L'athérosclérose, une pathologie inflammatoire	23
1.6 Les macrophages et l'homéostasie du cholestérol	23
1.7 Progression de l'athérosclérose et formation de la chape fibreuse	25
1.8 Stabilité de la plaque et rupture: le rôle clef des cellules musculaires lisses	25
1.9 Immunité adaptative dans l'athérosclérose: le rôle clef des lymphocytes	28
1.10 Les facteurs de risque	29
1.10.1 Facteurs environnementaux	29
1.10.2 Les dyslipidémies	29
1.10.3 Résistance à l'insuline et diabète.....	30
2. LES MONOCYTES	31
2.1 Les différentes cellules du système immunitaire	31
2.1.1 Les neutrophiles	31
2.1.2 Les cellules dendritiques.....	31
2.1.3 Les basophiles, mastocytes et éosinophiles	31
2.1.4 Les macrophages	31
2.2 Les monocytes	32
2.3 Hétérogénéité des monocytes	32
2.4 Recrutement des monocytes	34
3. LES MACROPHAGES ET LEURS PHENOTYPES FONCTIONNELS	35
3.1 Les macrophages	35
3.2 La polarisation <i>in vitro</i> des macrophages	35
3.2.1 Les macrophages M1	35
3.2.2 Les macrophages M2	36
3.2.3 Les macrophages M ϕ 1 et M ϕ 2	37
3.2.4 Les macrophages M4	37
3.3 Focus sur la polarisation alternative des macrophages	37
3.3.1 La voie de signalisation de l'IL4 et de l'IL-13	37

3.3.2 Les marqueurs de la polarisation alternative chez l'homme et chez la souris	38
3.3.3 Les macrophages alternatifs en physiopathologie	39
3.4 Effet et conséquences de la polarisation sur le métabolisme intracellulaire des macrophages	41
3.5 La polarisation des macrophages dans l'athérosclérose <i>in vivo</i>	41
3.5.1 Les phénotypes induits par les lipides.....	42
3.5.2 Les phénotypes induits par l'hémorragie et le fer.....	43
3.5.3 Les phénotypes induits par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance	43
3.6 La distribution des macrophages dans la lésion d'athérosclérose et la transition phénotypique.....	44
3.7 Les modulateurs du phénotype des macrophages	45
4. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	46
4.1 Généralités	46
4.2 La nomenclature	46
4.3 L'organisation en domaines fonctionnels.....	47
4.4 Le mécanisme d'action.....	48
4.4.1 La répression	48
4.4.1 La de-répression	48
4.4.3 L'activation de la transcription	49
4.5 L'activité des récepteurs nucléaires	50
4.5.1 Trans-activation et cis-activation	50
4.5.2 Trans-répression	50
4.6 Les facteurs modulant l'activité des récepteurs nucléaires	51
4.6.1 Liaison à l'ADN	52
4.6.2 L'activation par les ligands agonistes et antagonistes.....	52
4.6.3 Modifications post-traductionnelles	52
4.7 Les récepteurs orphelins	53
5. LA SOUS FAMILLE NR4A	55
5.1 La découverte	55
5.2 La structure	55
5.3 La distribution tissulaire	56
5.4 Les mécanismes d'action	56
5.4.1 Liaison à l'ADN	56
5.4.2 L'interaction avec les cofacteurs	57
5.5 Des récepteurs nucléaires orphelins.....	59
5.6 Des récepteurs nucléaires à réponse immédiate.....	60
5.7 Les isoformes	60
5.8 Les facteurs modulant l'activité transcriptionnelle.....	61
5.8.1 Modifications post-traductionnelles	61
5.8.2 Localisation cellulaire.....	62
5.8.3 Molécules agonistes ou co-activatrices.....	63
5.9 LES FONCTIONS BIOLOGIQUES	63
5.9.1 L'implication de NOR1 dans le métabolisme	63
5.9.1a Métabolisme des glucides	63

5.9.1b Métabolisme des lipides.....	64
5.9.1c Métabolisme oxydatif	64
5.9.1d Homéostasie énergétique.....	64
5.9.2 La régulation et le rôle fonctionnel de NOR1 dans les cellules vasculaires	65
5.9.2a NOR1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires	65
5.9.2b NOR1 dans les cellules endothéliales	65
5.9.2c NOR1 dans les macrophages	66
5.9.3 NOR1 et l'athérosclérose.....	67
5.10 NR4A ET LA POLARISATION DES MACROPHAGES	68
6. LA FAMILLE GROUCHO/TLE/GRG	71
6.1 La découverte	71
6.2 La structure	71
6.3 La distribution tissulaire	73
6.4 Mécanisme d'action	73
6.4.1 Interaction directe avec la chromatine	74
6.4.2 Interaction avec la machinerie transcriptionnelle	74
6.4.3 Interaction avec les désacétylases des histones (HDAC)	74
6.4.4 Interaction avec les protéines/oligomérisation	75
6.5 Gro/TLE comme co-activateurs	77
6.6 Gro comme convertisseur des activateurs en répresseurs.....	77
6.7 Facteurs modulant l'activité transcriptionnelle	78
6.7.1 Modifications post-traductionnelles	78
6.7.2 Présence du motif peptidique.....	79
6.7.3 Liaison avec des facteurs accessoires	79
6.8 Isoformes	80
6.9 FONCTIONS BIOLOGIQUES	81
6.9.1 Implication dans le cancer	81
6.9.1a. Sarcome synovial.....	81
6.9.1b Adénocarcinome du poumon.....	81
6.9.2 Implication dans l'hématopoïese	82
6.9.3 Implication dans la myogénese	82
6.9.4 Implication dans le système nerveux.....	82
6.9.5 Implication dans l'apoptose	83
6.9.6 Implication dans la réponse inflammatoire.....	83
6.9.7 Implication dans le diabète.....	84
6.9.8 Implication dans les monocytes	85
OBJECTIFS	86
RESULTATS	88
Article 1 : The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype	
Contexte bibliographique et résumé de l'étude	89
Résultats	91
Article 2 : TLE1 : un nouvel acteur dans les macrophages alternatifs ? Caractérisation de l'expression et des fonctions potentielles de TLE1 dans les macrophages	
2.1 Introduction	132

2.2 Matériels et Méthodes	132
Culture cellulaire	132
Analyse immunohistochimique et capture par microdissection laser (LCM)	133
Expression de l'ARNm et des protéines	133
Analyse par immuno- précipitation de la chromatine (ChIP) et immuno-précipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-Seq).....	133
ARN interférent	134
2.3 RESULTATS	134
TLE1 est induit dans les macrophages alternatifs M2 <i>in vitro</i>	134
TLE1 est exprimé dans les macrophages alternatifs M2 <i>in vivo</i>	136
L'expression de TLE1 est régulée par des stimuli pro- et anti-inflammatoires	136
Rôle potentiel de TLE1 dans la polarisation alternative des macrophages	137
TLE1 montre des propriétés anti-inflammatoires	138
Variation de l'expression de TLE1 dans différents contextes métaboliques.	139
2.4 CONCLUSION	140
2.5 PERSPECTIVES	141
Caractérisation de l'expression de TLE1 dans les sous-populations de macrophages CD68+MR+ de la plaque d'athérosclérose.....	141
Etude des fonctions de TLE1 dans les macrophages alternatifs humains	142
Caractérisation de l'expression de TLE1 dans des contextes pathologiques, tels que le diabète et l'obésité.	142
Etude de l'expression et des fonctions de TLE1 dans le métabolisme du glucose.	142
Identification du mécanisme d'action.	143
DISCUSSION ET CONCLUSION	144
NOR1 et la polarisation alternative des macrophages humains.	145
NOR1 et la balance entre les phénotypes de macrophages M2-M1 : implication dans la stabilité de la plaque d'athérosclérose	146
Caractérisation de l'expression et du rôle de TLE1 dans les macrophages alternatifs	148
CONCLUSION	149
BIBLIOGRAPHIE	151

LISTE DES FIGURES ET DES TABLES

- Figure 1. Genèse de l'athérosclérose
Figure 2. Structure de la paroi artérielle
Figure 3. Homéostasie du cholestérol dans les macrophages
Figure 4. Progression de la plaque d'athérosclérose
Figure 5. Les étapes de rupture de la plaque
Figure 6. La voie de signalisation de l'IL-4
Figure 7. Les principaux phénotypes des macrophages dans la lésion d'athérosclérose
Figure 8. Structure et organisation fonctionnelle des RN
Figure 9. Modèle d'assemblage des co-activateurs et co-répresseurs
Figure 10. Représentation schématique des phénomènes de cis-activation et trans-activation
Figure 11. Modèle de liaison des récepteurs NR4A à l'ADN
Figure 12. Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (LBD) de Nurr1
Figure 13. La structure des protéines Gro/TLE de grande taille
Figure 14. Les modèles de répression mis en place par Gro/TLE
Figure 15. Le mécanisme d'action de TLE : l'oligomérisation avec la première catégorie de protéines
Figure 16. TLE1 est induit dans les macrophages alternatifs M2 *in vitro*
Figure 17. TLE1 est induit dans les macrophages alternatifs M2 *in vivo*
Figure 17. TLE1 répond aux stimuli pro et anti-inflammatoires
Figure 19. TLE1 augmente l'expression des marqueurs de la polarisation alternative
Figure 20. TLE1 montre des effets anti-inflammatoires dans les macrophages RM
Figure 21. TLE1 montre des effets anti-inflammatoires dans les macrophages M2
Figure 22. TLE1 et le diabète de type 2
Figure 23. La balance entre les macrophages M1 et M2 et l'implication potentielle dans la stabilité de la plaque

Table 1. Les différents sous-types de monocytes chez l'homme et chez la souris

Table 2. Les marqueurs de la polarisation alternative chez l'homme et chez la souris

LISTE DES ABBREVIATIONS

6-MP	6-mercaptapurine
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ACAT-1	AcylCoA : cholestérol acyltransferase 1
AF-1	<i>Activation function</i>
AMAC1	<i>Alternative Macrophage Activation-Associated CC chemokine 1</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
Apo	Apolipoprotéine
AR	<i>Androgen Receptor</i>
Arg1	Arginase 1
ASC	<i>Activating Signal Cointegrator</i>
ATM	<i>Adipose Tissue Macrophages</i>
BF-1	<i>Brain factor-1</i>
BMDM	Macrophages issus de la moelle osseuse
CAMK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CCR2	<i>CC chemokine receptor type 2</i>
CCR5	<i>CC chemokine receptor type 5</i>
CD36	<i>Cluster of differentiation / Thrombospondin receptor</i>
CD43	<i>Sialophorin</i>
Cdc2	<i>Cell cycle dependent kinase 2</i>
CE	Cellules endothéliales
CK2	Caséine kinase 2
CMH	<i>Complexe majeure d'histocompatibilité</i>
CML	Cellules musculaires lisses
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CX3CR1	<i>Récepteur à la fractalkine</i>
CXCL10	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CXCL4	<i>Platelet factor-4</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
EGF	<i>Facteur de croissance de l'épiderme</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
Eh1	<i>Engrailed Homology 1</i>
ER	<i>Estrogen Receptor</i>
FOXP1	<i>Forkhead box G1</i>
FT	Facteur de transcription
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>
HAT	<i>Histone acteyltransferase</i>
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
Hex	<i>Hematopoietically expressed</i>
HIPK2	<i>Homeodomain-interacting protein kinase 2</i>
HMGB1	<i>High mobility group protein 1</i>
Hmox1	<i>Heme-oxygenase 1</i>
HNF4	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4</i>
HUVEC	Cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain

ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IKKi	<i>Inhibitor of kappa B kinase</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
JNK	<i>Jun-N-terminal kinase</i>
KLF	<i>Kruppel-like factor</i>
LAL	<i>Lysosomal acid lipase</i>
LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LEF	<i>Lymphoid Enhancer Factor</i>
LHR	<i>LH/CG receptor</i>
LOX-1	<i>Lectin-like oxLDL receptor</i>
LPS	<i>Lypopolysaccharide</i>
LRH1	<i>Liver Receptor Homologus Protein 1</i>
LXR	<i>Liver X Receptor</i>
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MARCKS	<i>Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate</i>
MCP1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MerTk	<i>Mer Receptor Tyrosine Kinase</i>
MMP9	<i>Matrix metalloprotease 9</i>
MR	<i>Récepteur au mannose</i>
MSR-1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>
N-Cor	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate</i>
NBRE	<i>NGFIB Response Element</i>
nCEH	<i>Neutral cholesterol ester hydrolase</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NOR1	<i>Neuron-derived orphan receptor 1</i>
NPC	<i>Niemann Pick</i>
NRRE	<i>Nuclear receptor responsive elements</i>
Nur77	<i>Neuron-derived clone 77</i>
Nurr1	<i>Nuclear receptor related 1</i>
NurRE	<i>Nur-responsive Element</i>
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PK	<i>Protein kinase</i>
PMA	<i>Phorbol myristate acetate</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPRE	<i>Elément de réponse à PPAR</i>
PRH	<i>Proline-rich homeodomain</i>
PXR	<i>Pregnane X Receptor</i>
RARα	<i>Retinoid Acid Receptor alpha</i>
RM	<i>Resting macrophages</i>
RN	<i>Récepteurs nucléaires</i>

RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
RXR	<i>Retinoid X Receptor</i>
SMRT	<i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SR-A	<i>Scavenger Receptor A</i>
SR-B1	<i>Scavenger Receptor class B, member 1</i>
SRC	<i>Steroid receptor coactivators</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SXR	<i>Steroid and Xenobiotic Receptor</i>
TAF	<i>TBP-associated factors</i>
TAM	<i>Tumor Associated Macrophages</i>
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
TG	<i>Triglycérides</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TGM2	<i>Transglutaminase 2</i>
Th	<i>Lymphocyte T Helper</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TIMP3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
TLDA	<i>Taqman Low-Density Array</i>
TLE	<i>Transducin-Like Enhancer of Split</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
Treg	<i>Lymphocytes T régulateurs</i>
Trx	<i>Thioredoxin</i>
UCP1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
Ym1/2	<i>Chitinase 3-like protein 3</i>

AVANT PROPOS

Les macrophages jouent un rôle crucial dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Le concept d'hétérogénéité des macrophages est maintenant bien admis. En fait, deux sous populations ont déjà été décrites dans la littérature: les macrophages pro-inflammatoires M1 et les macrophages alternatifs M2 qui présentent un phénotype anti-inflammatoire. Les fonctions des macrophages sont régulées par des facteurs de transcription. Le laboratoire d'accueil a réalisé une analyse transcriptomique des gènes différemment exprimés entre les macrophages humains non polarisés (RM) et les macrophages M2. Une étude plus détaillée des facteurs de transcription dont l'expression est fortement induite dans les macrophages alternatifs comparativement aux macrophages RM a mis en évidence la présence de NOR1 (*Neuron-derived Orphan Receptor 1*) et TLE1 (*Transducin Like Enhancer of Split 1*).

Mon travail de thèse a comme objectif la caractérisation de l'expression et des fonctions potentielles de ces deux facteurs de transcription dans les macrophages alternatifs humains.

Dans la partie de ce manuscrit relative à l'étude bibliographique j'exposerai brièvement le processus de l'athérosclérose en soulignant le rôle central des macrophages. Par la suite, je me focaliserai sur cette cellule et ses différents phénotypes fonctionnels en donnant plus de détails sur la polarisation alternative des macrophages. Cette démarche bibliographique amènera, après une partie générale sur la famille des facteurs de transcription orphelins NR4A et celle des répresseurs de la transcription Groucho/TLE, à établir l'état de connaissance sur NOR1 et TLE1, qui font partie de ces deux familles respectives et qui constituent le sujet de ce travail.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse seront présentés précédés par un résumé qui resitue l'étude dans le contexte bibliographique. Enfin, les conclusions et perspectives dégagées par ces études seront discutées de façon critique.

INTRODUCTION

1. L'ATHEROSCLEROSE

1.1 Une maladie chronique de la paroi artérielle : définition

« Tout comme l'eau dans un boyau d'arrosage, le sang circule dans les artères pour amener l'oxygène et les substances nutritives aux organes. L'athérosclérose apparaît lorsque les artères sont obstruées par la formation de plaques, elles perdent leur élasticité et rétrécissent; la circulation du sang se trouve alors ralentie ou bloquée » (de « Fondation de maladies du cœur et de l'AVC »).

L'athérosclérose est une pathologie complexe, d'évolution lente et silencieuse, caractérisée par le dépôt de lipides dans les artères (Lusis 2000). Elle est la cause principale des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et de l'ischémie des membres inférieurs pouvant se compliquer vers la gangrène. Elle est aujourd'hui de part ses manifestations cliniques la première cause responsable des décès dans le monde (Fowkes, et al. 2013). Cependant l'étiologie de l'athérosclérose n'a pas encore été clairement définie. Il est accepté par la communauté scientifique que cette pathologie soit d'origine multifactorielle (Ross 1999). Parmi les facteurs de risque, on peut citer ceux d'ordre génétique et ceux environnementaux comme la sédentarité, un régime riche en gras et le tabagisme (Strong, et al. 1995).

L'athérosclérose est le résultat de l'interaction complexe entre plusieurs éléments, notamment les cellules circulantes, les lipoprotéines et les cellules endothéliales de la paroi vasculaire (Libby 2002; Wilson, et al. 2009). L'évolution de la plaque d'athérosclérose se déroule en plusieurs étapes. En premier lieu apparaissent les stries lipidiques. Ces lésions précoces correspondent à l'accumulation de macrophages qui, par leur aptitude à la phagocytose, vont tenter de résorber le cholestérol associé aux LDL (*Low density Lipoprotein*) qui s'accumule au sein de la paroi vasculaire. Ainsi faisant, les macrophages évoluent en cellules spumeuses caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Les stries lipidiques apparaissent en général chez les enfants ; à partir de l'âge de 15 ans 50% des Hommes en présentent au niveau aortique et coronaire, et 8-10% d'entre eux présentent d'ailleurs déjà des lésions d'athérosclérose. Les lésions évoluent ensuite vers un stade plus avancé aussi appelé plaque d'athérosclérose ou athérome (Stary, et al. 1995). Le développement d'une plaque d'athérosclérose simple, puis d'une plaque d'athérosclérose complexe, va aboutir à l'expression clinique de la pathologie (Imhof and Aurrand-Lions

2004). La lésion avancée est caractérisée par une accumulation importante de lipides extracellulaires (Stary, et al. 1995), qui constituent le cœur lipidique. Cela s'accompagne d'un dépôt de matériel fibreux, de débris cellulaires et de la présence des cellules musculaires lisses (CML). Ensuite, la lésion s'organise et se couvre d'une chape fibreuse. Tant que celle-ci isole le cœur lipidique des éléments circulants du sang, la plaque reste stable. Mais si la chape fibreuse se rompt et expose le cœur lipidique au flux sanguin, les éléments pro-agrégants tels que les plaquettes vont alors s'activer et former un thrombus. Dans ce contexte, le vaisseau sanguin voit sa lumière interne se restreindre et le flux sanguin est ralenti voir arrêté. C'est à ce moment que les manifestations cliniques vont apparaître (Libby, et al. 2000) (Figure 1).

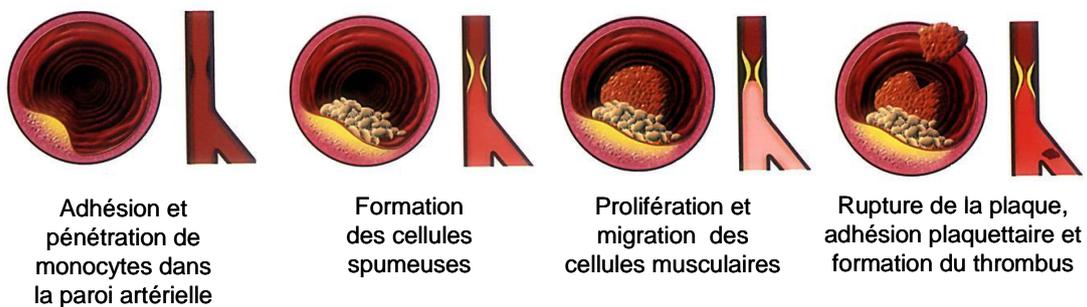


Figure 1. Genèse de l'athérosclérose (de www.medicine-et-santé.com)

1.2 Structure de la paroi vasculaire

Les artères présentent toutes la même organisation structurale. Leur paroi est constituée de trois couches qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur, l'intima, la media et l'adventice (Figure 2).

1.2.1 L'intima

Cette tunique est la plus interne et la plus fine ; elle est composée d'une mono couche de cellules endothéliales et d'un tissu protéique matriciel et fibreux qui entoure les cellules. C'est au niveau de l'espace sous endothéliale que se développe la plaque d'athérome.

1.2.2 La media

Il s'agit de la tunique la plus épaisse ; elle contient des cellules musculaires lisses qui s'empilent de façon concentrique. Le nombre de ces couches change en fonction du type d'artère : d'une seule pour les artérioles à plusieurs couches pour les artères élastiques de plus gros calibre.

1.2.3 L'adventice

Cette tunique est la plus externe. Elle est composée de tissu conjonctif et de fibres élastiques. Elle contient les *vasa vasorum* (vaisseaux capillaires irrigants la paroi artérielle) ainsi que des fibres nerveuses du système autonome sympathique et parasymphatique.

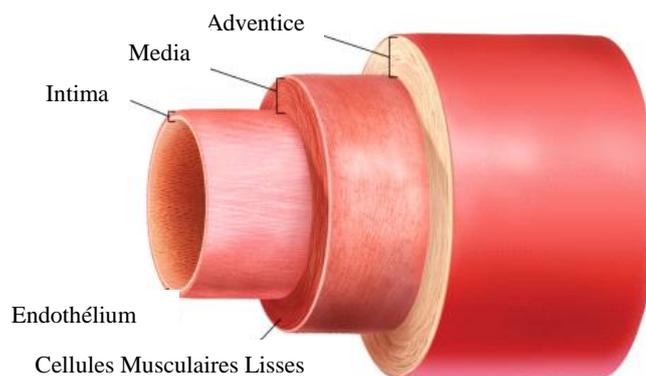


Figure 2. Structure de la paroi artérielle (de www.nap.edu)

1.3 Accumulation et modification des lipoprotéines dans l'intima artérielle

Il est aujourd'hui communément admis que les lipoprotéines de basse densité (LDL) soient un des facteurs principaux dans le développement de l'athérosclérose. Il a été bien démontré que l'hypercholestérolémie familiale, pathologie associée à une accumulation anormale de cholestérol dans le sang, provoque une apparition prématurée de l'athérosclérose (Goldstein, et al. 1983). Ces lipoprotéines servent de transporteurs pour le cholestérol dans le sang. Néanmoins, en cas d'excès de cholestérol, celui-ci peut s'accumuler, notamment au niveau sous-intimal de la paroi des vaisseaux. Ce phénomène s'effectue de manière passive, cette pénétration étant favorisée par une perméabilité accrue de l'endothélium, conséquence de l'état inflammatoire, de l'hypertension artérielle et du contexte hémodynamique (Tedgui, et al. 1997). Les LDL sont retenues dans l'espace sous-endothéliale grâce à des interactions entre l'apolipoprotéine B100 et les protéoglycanes de la matrice extra-cellulaire (Skalen, et al. 2002). Les LDL enchâssées vont ensuite subir des modifications telles que l'oxydation, l'agrégation et la glycation (Glass and Witztum 2001). Les LDL peuvent être modifiées par oxydation *in vivo* et *in vitro* (Berliner and Heinecke 1996). Par exemple, les LDL oxydées peuvent être générées suite à une incubation avec les cellules endothéliales (Berliner and Heinecke 1996). Les LDL peuvent être oxydées aussi par action de l'hème/ hémoglobine (Nagy, et al. 2010) et par action des enzymes, notamment la NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase (Bey and Cathcart 2000). *In vivo*, le taux des LDL oxydées dans l'intima est fonction de la concentration de LDL natives présentes. Les LDL oxydées sont détectables dans le sang circulant ainsi que dans les lésions d'athérosclérose.

1.4 L'activation des cellules endothéliales

Les LDL oxydées sont impliquées dans l'induction de l'expression des molécules d'adhérence telles que VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule*) et ICAM1 (*intercellular adhesion molecule*), importantes pour l'adhérence des monocytes et des lymphocytes T à la surface endothéliale des grosses artères (Li, et al. 1993). De plus, les LDL oxydées induisent la sécrétion de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) par les macrophages et de MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) par les cellules endothéliales (Boisvert 2004; Chatterjee, et al. 1997). Les monocytes circulants adhèrent ainsi à la surface de l'endothélium et pénètrent dans l'espace sous-endothélial, selon un processus appelé diapédèse (Rot and von Andrian 2004). Par la suite, les monocytes piégés se différencient en macrophages. Le processus de recrutement de monocytes sera expliqué d'avantage dans la partie 2.4.

1.5 L'athérosclérose, une pathologie inflammatoire

L'accumulation des macrophages entraîne une réaction inflammatoire chronique qui est impliquée d'une façon importante dans la croissance de la plaque même. En effet, les cellules de la paroi vasculaire produisent de nombreuses cytokines et facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-6 (*interleukin*), l'IL-1 β , la MMP9 (*matrix metalloprotease 9*) et le TNF α (*tumor necrosis factor α*). Une partie importante de ces molécules favorise l'adhérence de nouveaux monocytes ainsi que leur diapédèse entre les jonctions des cellules endothéliales. Ces réactions résultent d'un état de déséquilibre assez complexe entre les cytokines produites, certaines ayant une action anti- inflammatoire, d'autre une action pro-inflammatoire (Tedgui and Mallat 2006).

1.6 Les macrophages et l'homéostasie du cholestérol

Les LDL oxydées sont impliquées dans l'accumulation du cholestérol des macrophages. Comme énoncé auparavant, les macrophages subissent des modifications phénotypiques et accumulent les LDL oxydées. Ceci conduit à leur évolution en cellules spumeuses. Ces cellules spumeuses apparaissent comme de grosses cellules dont le cytoplasme est rempli de gouttelettes d'esters de cholestérol (Witztum and Steinberg 2001). Il a été démontré que les LDL oxydées sont des ligands pour les récepteurs « scavenger » exprimés par les macrophages, tels que SR-A (*scavenger receptor A*), SR-B1 (*scavenger receptor classe B, member 1*), CD36 (*cluster of differentiation*) (Manning-Tobin, et al. 2009) et LOX-1 (*Lectin-like oxLDL receptor*) (Mehta 2004) (Figure 3). Une fois dans le cytoplasme, le cholestérol estérifié contenu dans les LDL est hydrolysé sous forme de cholestérol libre (C) par l'enzyme *lysosomal acid lipase* (LAL) dans les lysosomes des macrophages. Ce cholestérol libre est ensuite mobilisé par les protéines NPC1 et 2 (*Niemann-Pick*) qui sont responsable de la sortie du cholestérol des endosomes (Carstea, et al. 1997). Un excès de ce cholestérol libre est très toxique pour la cellule. Pour cette raison il peut être re-estérifié (CE) par l'enzyme *acylCoA : cholesterol acyltransferase 1* (ACAT-1) (Brown, et al. 2000). Le cholestérol est donc stocké sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des macrophages; ces gouttelettes sont caractérisées par un cœur hydrophobique entouré de phospholipides. Le processus d'estérification n'est pas irréversible ; l'hydrolyse du cholestérol estérifié en cholestérol libre est opérée par l'enzyme *neutral cholesterol ester hydrolase* (nCEH). Cette réaction permettra par la suite au cholestérol libre de sortir de la cellule grâce au processus appelé transport inverse du cholestérol (Rosenson, et al. 2012; Sekiya, et al. 2011). Ceci représente un système d'épuration du cholestérol en excès des macrophages. Le transport inverse du cholestérol est

le processus qui véhicule le cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie, ce dernier étant le seul organe capable de cataboliser le cholestérol en tant que tel ou sous forme d'acides biliaires. La première étape du transport inverse du cholestérol est représentée par l'efflux du cholestérol des membranes vers des accepteurs de type HDL (*High Density Lipoprotein*). Deux mécanismes coexistent afin d'assurer cet efflux du cholestérol des macrophages (Tall, et al. 2002). Le premier mécanisme appelé diffusion passive consiste à la désorption du cholestérol de la membrane plasmique et sa diffusion vers son accepteur de type HDL. L'efflux du cholestérol peut aussi se faire de façon dépendante de l'ATP via le transporteur « *ATP Binding Cassette* » (ABC)A1 vers l'apoA1 et via le transporteur ABCG1 vers les HDL : on parle dans ce cas d'efflux du cholestérol. Des études plus récentes ont montré que ABCA1 et ABCG1 peuvent fonctionner en synergie et permettre ainsi l'export du cholestérol vers l'ApoA1 (Gelissen, et al. 2006). Le cholestérol associé aux HDL est ensuite éliminé de la circulation sanguine suite à la liaison de ces particules avec le récepteur SR-B1 exprimé par les hépatocytes et qui est capable de reconnaître les apolipoprotéines apoE et apoA.

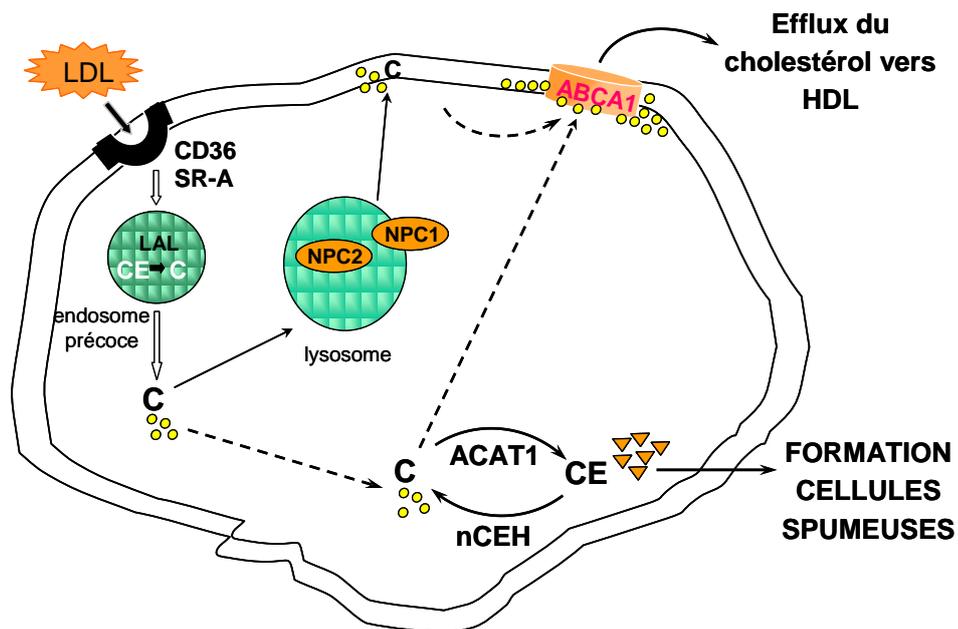


Figure 3. Homéostasie du cholestérol des macrophages.

1.7 Progression de l'athérosclérose et formation de la chape fibreuse

La progression de la plaque (Figure 4) est un phénomène lent caractérisé par l'infiltration de lipoprotéines, l'accumulation des cellules spumeuses et la prolifération des CML qui synthétisent la matrice extracellulaire (Lusis 2000). Au fil du temps, les cellules spumeuses entrent en apoptose, ce qui a pour conséquence l'accumulation de lipides et de débris cellulaires dans l'intima. Ces événements favorisent la formation du cœur nécrotique. La plaque d'athérosclérose se couvre par la suite d'une chape appelée « chape fibreuse » composée des CML et de protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène, l'élastine et les proteoglycanes (Raines and Ferri 2005). Le rôle principal de cette chape est d'isoler le cœur de la plaque du fluide sanguin. L'intégrité de cette chape fibreuse est essentielle pour la stabilité de la plaque.

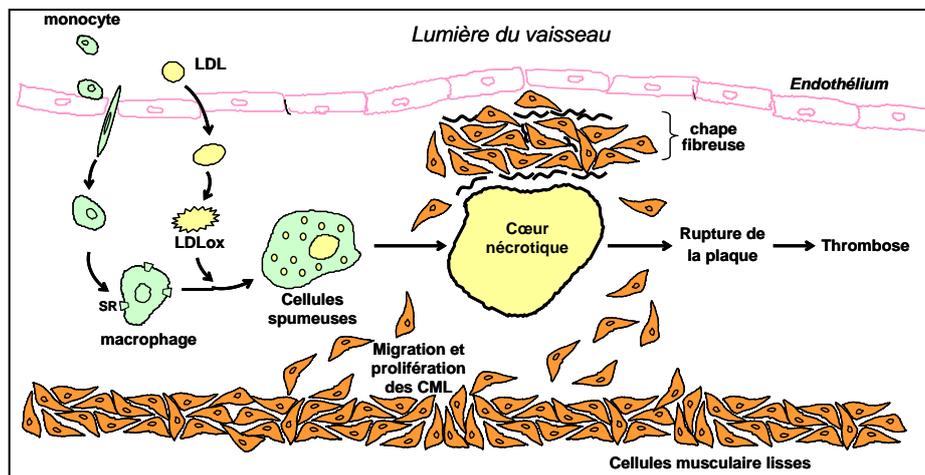


Figure 4. Progression de la plaque d'athérosclérose

1.8 Stabilité de la plaque et rupture: le rôle clef des cellules musculaires lisses

La partie la plus vulnérable de la plaque est la région de l'épaulement, où la chape fibreuse est plus fine (Falk 1985). Des études ont montré une diminution en collagène autour des plaques dégradées. Ceci peut s'expliquer par une réduction de la matrice produite par les CML (Davies, et al. 1993).

Les CML ont un rôle crucial dans la stabilité de la plaque. Lorsqu'elles perdent le phénotype contractile pour acquérir celui dédifférencié, elles développent la capacité de produire une grande variété de composants de la matrice, tels que le collagène, l'élastine, les proteoglycanes et sécrètent plusieurs cytokines et facteurs de croissance (Raines and Ferri

2005; Ross 1993). Dans la paroi des vaisseaux normaux, les CML sont présentes dans la média et sont entourées par le collagène de type IV. Les enzymes protéolytiques produites par les macrophages sont responsables de la digestion de ce collagène. De ce fait, les CML sont libres de migrer dans l'intima, d'y proliférer en provoquant un épaississement de la paroi (Newby 1997). Ainsi les CML produisent des enzymes protéolytiques impliqués dans la destruction de la plaque : il s'agit des metalloprotéinases de la matrice ou MMPs (Loftus, et al. 2002). Les MMPs sont caractérisées par la présence du ion Zinc dans leur site actif. Leur activité peut être régulée par PAI (*plasminogen activator inhibitor-1*) (Lijnen 2001) et par des inhibiteurs tels que les TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) (Gomez, et al. 1997). MMP9 est la forme dominante dans les lésions d'athérosclérose (Thompson, et al. 1995), suivie par MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 et MMP13 (Galis, et al. 1994; Herman, et al. 2001; Sukhova, et al. 1999) (Figure 5).

La rupture de la plaque constitue le dernier stade du développement de l'athérosclérose, ce qui peut amener à la thrombose, qui consiste à la mise en contact entre les éléments thrombogènes du centre lipidique de la plaque et le sang. Lorsque le thrombus, qui est le résultat de l'agrégation plaquettaire et l'activation du système de coagulation humorale, obture complètement l'artère, on parle d'ischémie aigue (Wasserman and Shipley 2006).

La rupture de la plaque peut être expliquée à la fois par des facteurs extrinsèques comme une poussée hypertensive ou un effort important et à la fois par des facteurs intrinsèques comme la composition de la lésion. En fait, la proportion entre lipides et tissus fibreux au sein de la plaque joue sûrement un rôle dans sa vulnérabilité (Felton, et al. 1997). D'ailleurs, les plaques plus prônes à évoluer vers l'ischémie aigue sont celles avec un centre lipidique important et une chape fibreuse relativement fine.

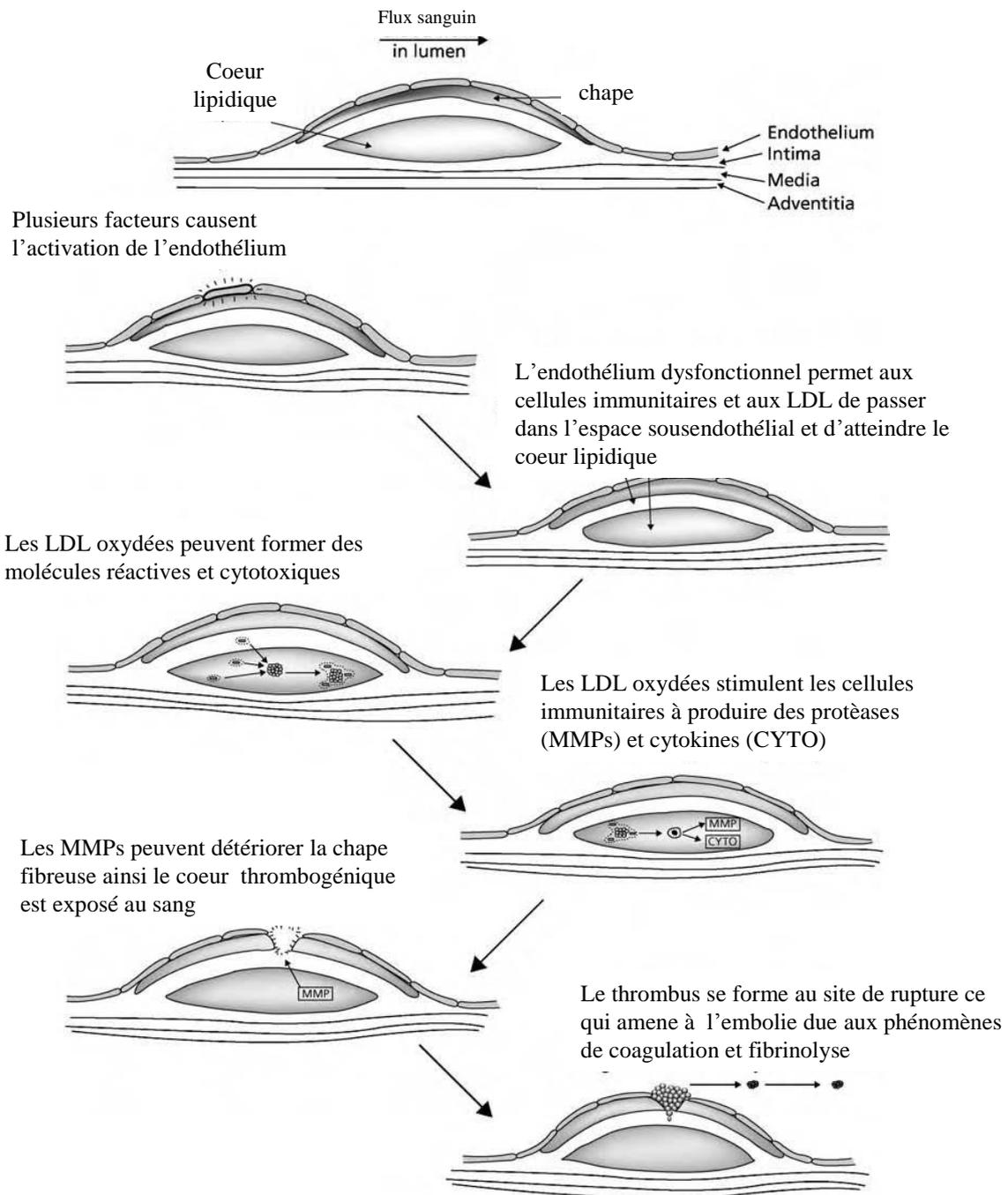


Figure 5. Les étapes de rupture de la plaque d'après « Mechanisms of Vascular Disease (Fitridge & Thompson 2006) »

1.9 Immunité adaptative dans l'athérosclérose: le rôle clef des lymphocytes

L'immunité adaptative consiste en une réponse immunitaire qui se développe suite à une réponse innée instaurée lors du premier contact avec le pathogène. Elle est dotée d'une mémoire. Cette réponse se fait *via* le rôle central des lymphocytes T et B (Gordon 2002). Les lymphocytes T viennent à maturation dans le thymus où ils se distinguent deux sous-types : ceux qui expriment le CD4+ ou lymphocytes T Helper (Th) et ceux qui expriment le CD8+ et qui sont appelés lymphocytes cytotoxiques. Les lymphocytes CD8+ tuent les cellules infectées par les virus, les bactéries ainsi que les cellules tumorales. Ces lymphocytes sont capables de reconnaître leur cible grâce à la liaison avec les cellules qui expriment le CMH I (complexe majeure d'histocompatibilité de classe I). Les lymphocytes T CD4+ sont capables d'activer les autres cellules du système immunitaire et ils se lient aux cellules qui expriment le CMH II. Ils peuvent se différencier en plusieurs sous-types de lymphocytes tels que Th1, Th2, Th3, Th17 qui secrètent des cytokines différentes (Ait-Oufella, et al. 2006; Gutcher and Becher 2007).

Les lymphocytes T ne sont pas nombreux dans la plaque d'athérosclérose. Cependant, ils semblent jouer un rôle dans le développement de cette pathologie (Dansky, et al. 1997). Les Th1 produisent, en plus des interleukines IL-12 et IL-18, l'interféron IFN γ qui a un rôle délétère dans la plaque. Pour cette raison, les Th1 sont définis pro-athérogènes (Mallat, et al. 2009). D'ailleurs, il a été démontré que la déficience en T-bet, facteur de transcription nécessaire pour la différenciation des cellules T, réduit la formation des lésions athéromateuses dans les souris déficientes pour le récepteur aux LDL (LDLR^{-/-}) (Buono, et al. 2005). En ce qui concerne les lymphocytes Th2, à première vue on pourrait s'attendre à un rôle protecteur dans l'athérosclérose, compte tenu du fait qu'ils antagonisent l'action athérogène des Th1. Cependant, ils produisent l'IL-4 qui montre aussi un effet pro-athérogène par l'activation des CML et des cellules endothéliales, provoquant ainsi la diminution de dépôts en collagène et l'augmentation de la production des protéases (Leskinen, et al. 2003). A contrario, les lymphocytes T régulateurs (Treg) exprimant le CD25 répriment l'athérosclérose selon un mécanisme qui implique le facteur de transcription FoxP3. En fait, ceci induit la production d'IL-2, TGF β et IL-10 qui montrent notamment des propriétés athéro-protectrices (Ait-Oufella, et al. 2006; Mallat, et al. 2003; Mor, et al. 2007).

De même, les lymphocytes B semblent avoir un effet bénéfique contre l'athérosclérose. Par leur capacité de production d'anticorps et de présentation d'antigène (Signer, et al. 2007), ils ont un rôle athéroprotecteur via la production d'IL-5 et d'anticorps dirigés contre les LDLox (Caligiuri, et al. 2002). De plus, leur présence au sein des plaques d'athérome a déjà été

démontrée chez l'homme ainsi que dans des modèles murins (Watanabe, et al. 2007; Zhou and Hansson 1999).

1.10 Les facteurs de risque

Le développement de l'athérosclérose est influencé par nombreux paramètres, aussi appelés facteurs de risque, qui peuvent être génétiques ou environnementaux. Avec le terme syndrome métabolique, la communauté scientifique indique l'ensemble des perturbations métaboliques qui prédisposent au développement des maladies cardiovasculaires. Ce type de syndrome est défini par la présence d'au moins trois des paramètres suivants: indice de masse corporelle (IMC) $>30 \text{ kg/m}^2$; obésité abdominale (tour de la taille $> 102 \text{ cm}$ chez l'homme, $>88 \text{ cm}$ chez la femme) ; triglycérides $>1,7 \text{ mmol/L}$; HDL $< 1,04 \text{ mmol/L}$ chez l'homme, $< 1,29 \text{ mmol/L}$ chez la femme; hypertension $> 130/85 \text{ mmHg}$; glycémie à jeun $> 6,1 \text{ mmol/L}$ (McEvoy, et al. 2005).

Parmi ces anomalies métaboliques on peut citer : les dyslipidémies, la résistance à l'insuline et l'obésité. La probabilité de survenue d'un accident cardiovasculaire est multipliée par 4 en présence d'un syndrome métabolique. La section suivante détaillera ces facteurs de risque cardio-vasculaire.

1.10.1 Facteurs environnementaux

Le tabagisme représente un facteur de risque élevé pour le développement des maladies cardiovasculaires; il constitue un risque pour l'intégrité des artères, la coagulation du sang et la tension artérielle. D'autres exemples de facteurs environnementaux sont la sédentarité, l'abus d'alcool et le stress. L'âge est un autre paramètre à prendre en compte. En effet, le risque du développement des plaques augmente à partir de 45 ans pour les hommes et à partir de 55 ans pour les femmes. Enfin, le régime alimentaire a aussi son impact ; il suffit de penser qu'au paléolithique il n'existait pas de complications vasculaires. Ces complications ont commencé à apparaître au néolithique quand les hommes ont changé leurs habitudes alimentaires vers des aliments plus riches en gras et saturés en sel.

1.10.2 Les dyslipidémies

Le terme « dyslipidémies » indique l'ensemble des anomalies des taux plasmatiques de lipides. Ce terme définit un taux élevé de LDL et/ou de triglycérides (TG) et/ou un taux bas en HDL. Des études épidémiologiques ont mis en évidence qu'une faible concentration en HDL et une haute concentration en LDL et TG constituent un facteur de risque important pour les

maladies cardiovasculaires. Miller et collègues (Miller and Miller 1975) ont démontré une relation inverse entre les concentrations plasmatiques en HDL et le risque du développement de l'athérosclérose. Ceci s'explique par le fait que les HDL ont une action athéro-protectrice, car elles stimulent le transport inverse du cholestérol et protègent les LDL du processus d'oxydation. En parallèle, des anomalies quantitatives mais aussi qualitatives des lipoprotéines riches en TG sont des facteurs clefs dans le développement des maladies cardiovasculaires (Ginsberg and Tuck 2001). Le taux circulant de lipoprotéines riches en TG dépend autant de leur synthèse que de leur catabolisme : une production excessive, une hydrolyse partielle et une mauvaise épuration de la circulation, conduisent à un cadre pro-athérogène (Ginsberg and Tuck 2001).

1.10.3 Résistance à l'insuline et diabète

La résistance à l'insuline augmente également le risque du développement de l'athérosclérose (Despres and Marette 1994). Elle est associée à une dyslipidémie caractéristique qui conduit à une hypertriglycéridémie et à une baisse de la concentration des HDL (Ginsberg and Tuck 2001). Un taux d'acides gras élevé s'accompagne d'une augmentation de la synthèse de TG par le foie et d'une production accrue de VLDL (*very low density lipoproteins*). Les concentrations de LDL ne changent pas beaucoup mais c'est leur composition qui se modifie. En effet, les patients résistants à l'insuline et les patients diabétiques de type 2 (DT2) présentent des LDL plus petites et plus denses, augmentant leur pouvoir athérogène (Yoshino, et al. 2002).

2. LES MONOCYTES

2.1 Les différentes cellules du système immunitaire

Dans la section précédente nous avons déjà parlé des lymphocytes comme ayant un rôle dans le développement de l'athérosclérose et comme cellules faisant partie du système immunitaire. Le système immunitaire est extrêmement complexe et il se compose de nombreux autres types cellulaires.

2.1.1 Les neutrophiles:

Les neutrophiles sont classifiés comme des phagocytes car ils circulent dans le sang à la recherche de pathogènes. Pendant la phase aigue de l'inflammation, les neutrophiles migrent dans les tissus pour rejoindre les sites d'inflammation et éliminer les pathogènes en se servant de substances microbicides contenues dans des vésicules spécialisées (Mantovani, et al. 2011).

2.1.2 Les cellules dendritiques :

Les cellules dendritiques sont également classifiées comme des phagocytes. Elles internalisent le pathogène et en présentent les débris sous forme d'antigène. L'antigène sera ensuite présenté aux lymphocytes T dans le but de les activer (Dominguez and Ardavin 2010).

2.1.3 Les basophiles, mastocytes et éosinophiles:

A la différence des phagocytes, ces cellules s'occupent de neutraliser les pathogènes qui sont trop grands pour être ingérés. En fait, elles sont capables de les éliminer suite à la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques, en créant un environnement toxique tout au tour du parasite (Prussin and Metcalfe 2006; Siracusa, et al. 2010).

2.1.4 Les macrophages :

Issus de la différenciation des monocytes circulants, les macrophages sont les cellules phagocytaires les plus grandes de l'organisme. Leur rôle principal est celui de phagocyter les pathogènes et de les détruire complètement. Ils sont souvent définis comme des cellules plastiques en accord avec le fait qu'ils peuvent acquérir des phénotypes différents selon le stimulus environnemental qu'ils rencontrent.

Dans la suite de ce chapitre, je présenterai plus en détail les monocytes. Les macrophages et leurs différents phénotypes fonctionnels feront l'objet du chapitre 3.

2.2 Les monocytes

Les monocytes se développent à partir des cellules de la moelle osseuse suite à un processus appelé hématopoïèse. La prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques ou sanguines en monocytes sont influencées par le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) et le GM-CSF (*granulocyte macrophage stimulating factor*). Les monocytes quittent la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine où ils circulent pendant une semaine avant d'infiltrer les différents tissus. Les monocytes matures constituent environ le 10% de la population de leucocytes circulants chez l'homme et sont très hétérogènes en terme de taille, granulosité et morphologie du noyau (Auffray, et al. 2009).

2.3 Hétérogénéité des monocytes

Selon la nomenclature récemment approuvée par le comité en charge de l'*International Union of Immunologic Societies* (Ziegler-Heitbrock, et al. 2010), chez l'homme, les monocytes sont classifiés en trois populations sur la base de l'expression des marqueurs de surface CD14 et CD16 (Table 1). La population la plus abondante (90%) est constituée par les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻ qui sont aussi appelés « classiques ». A l'autre extrême du spectre, la population la moins représentée (10%) se compose des monocytes « intermédiaires » ou CD14⁺⁺CD16⁺ et des monocytes appelés « non classiques » qui sont des monocytes CD14⁺CD16⁺⁺. Il a été récemment mis en évidence que le nombre de monocytes non classiques qui expriment très fortement le CD16 augmente dans un contexte inflammatoire et d'infection virale ainsi que dans des pathologies auto-immunes (Wong, et al. 2012). Il semblerait que les monocytes classiques et intermédiaires soient pro-inflammatoires (Ingersoll, et al. 2010) tandis que les monocytes non classiques auraient plutôt un rôle de surveillance (Geissmann, et al. 2003). Cependant, une autre étude suggère que la population de monocytes intermédiaires est capable de produire l'IL-10 et jouerait un rôle anti-inflammatoire (Skrzeczynska-Moncznik, et al. 2008). Chez la souris (Table 1), trois différentes populations de monocytes existent également, caractérisées par l'expression des marqueurs de surface CD43 (*sialophorin*) et Ly6C (*lymphocyte antigen 6 complex, locus C1*) (Geissmann, et al. 2003). A nouveau, la population la plus représentée est constituée par les monocytes pro-inflammatoires « classiques » ou Ly6C⁺⁺CD43⁺, suivie par les deux autres types de monocytes : les intermédiaires Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺ et les monocytes non classiques ou de

surveillance Ly6C⁺CD43⁺⁺. Les monocytes inflammatoires humains et murins se caractérisent par une expression forte des molécules de surface CCR2 (*CC-chemokine receptor 2*) et une expression diminuée de CX3CR1 (*CX3C chemokine receptor 1*, récepteur à la fractalkine). D'autre part, les monocytes de « surveillance » non classiques n'expriment pas CCR2 mais présentent CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*). Les monocytes inflammatoires répondent ainsi à la chimiokine CCL2 qui en induit le recrutement dans le site d'inflammation. En revanche, les monocytes de surveillance répondent à la chimiokine CX3CR1 qui est présente soit sous forme soluble soit exprimée à la membrane des cellules endothéliales ainsi que par différents tissus (Auffray, et al. 2007; Soehnlein, et al. 2013). Dans ce cas, les monocytes sont recrutés dans des sites non inflammatoires pour se différencier en macrophages résidents. De plus, il a été démontré chez la souris que les monocytes qui expriment faiblement Ly6C migrent peu au site d'inflammation (Sunderkotter, et al. 2004). Une différence importante entre les sous-populations de monocytes chez l'homme et la souris consiste en leur distribution relative. En fait, les monocytes Ly6C⁻ ou « non classiques » représentent approximativement près de 50% de monocytes circulants chez la souris, tandis que chez l'homme les monocytes CD16⁺ ne dépassent pas le 15% (Passlick, et al. 1989). Une explication possible de cette différence a été proposée par Ziegler-Heitbrock qui suggère que le nombre élevé de monocytes dans la circulation sanguine chez la souris pourrait être une conséquence du stress induit par la piqûre cardiaque ou l'administration de l'anesthésique. Cependant cette hypothèse reste à valider (Ziegler-Heitbrock 2014).

Une question qui est toujours d'actualité est celle qui concerne l'origine de ces différentes sous-populations de monocytes. Plusieurs études, dont la quasi-totalité réalisées chez la souris, ont essayé d'y répondre. Il n'est toujours pas clair si les sous-types de monocytes sont issus de différentes voies de maturation/différenciation à partir d'un progéniteur commun ou s'ils correspondent à différents stades du même processus de développement. Dans ce cas, les monocytes intermédiaires constitueraient un stade intermédiaire d'un point de vue phénotypique et du développement entre les monocytes classiques et les monocytes non classiques (Italiani and Boraschi 2014). Cette deuxième hypothèse semble être la plus accréditée. En fait, si les premières études suggéraient que les monocytes Ly6C⁺ sont recrutés au site d'inflammation mais qu'ils ne sont pas les précurseurs de Ly6C⁻, récemment des expériences de greffe de Ly6C⁺ ont mis en évidence que ceux-ci différencient spontanément en monocytes Ly6C⁻ dans la circulation sanguine (Varol, et al. 2007; Yona, et al. 2013).

Espece	Sous-type	% de monocytes circulants	marqueurs	recepteur aux chimiokines	fonctions
Homme	classique	85%	CD14++CD16-	CCR2+CX3CR1-	inflammatoires
	intermédiaire	5%	CD14++CD16+	CCR2-CX3CR1+	inflammatoires
	non-classique	10%	CD14+CD16++	CCR2-CX3CR1+	surveillance
Souris	Ly6Chigh	60%	Ly6C++ CD43+	CCR2+CX3CR1-	inflammatoires
	Ly6Clow	40%	Ly6C+CD43++	CCR2CX3CR1+	surveillance

Table 1. Les différents sous-types de monocytes chez l'homme et chez la souris

2.4 Recrutement des monocytes

En conditions physiologiques, les monocytes circulent librement dans le sang. Au cours d'une réaction inflammatoire causée par un pathogène ou une autre agression physique ou chimique, les cellules endothéliales expriment à leur surface le MCP-1, l'IL-8 et la fraktalkine, ainsi que la sélectine P et la sélectine E, des molécules d'adhérence (Boisvert 2004). Au même temps, les monocytes circulants expriment les récepteurs pour ces sélectines et l'interaction entre les deux provoque le ralentissement des monocytes qui commencent à rouler au niveau de la surface de l'endothélium sans cependant s'arrêter complètement. C'est seulement suite à l'interaction entre les intégrines exprimées par les monocytes et les molécules d'adhérence VCAM et ICAM que la force de liaison devient plus importante permettant ainsi aux monocytes de s'arrêter complètement (Babaev, et al. 2007). Enfin, les monocytes passent entre les jonctions de cellules endothéliales par un mécanisme appelé « diapédèse » et sont guidés par un gradient de chimiokines au cœur de l'inflammation, où ils se différencient en macrophages (Rot and von Andrian 2004).

3. LES MACROPHAGES ET LEURS PHENOTYPES FONCTIONNELS

3.1 Les macrophages

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les macrophages sont des cellules clef du développement de l'athérosclérose. Ils font aussi parti de l'arsenal de cellules constituant le système immunitaire. Ils se différencient à partir des monocytes, lorsque ces derniers quittent la circulation sanguine pour rejoindre les tissus. Selon le tissu ciblé, différents types de macrophages peuvent être décrits, notamment les cellules de Kupffer dans le foie (Haubrich 2004), les ostéoclastes dans l'os (Quinn, et al. 2005), les macrophages alvéolaires dans le poumon (Lambrecht 2006), les cellules microgliales dans le cerveau (Aloisi 2001), les cellules de Langherans dans l'épiderme (Merad, et al. 2008) et les macrophages spléniques dans la rate (Mebius and Kraal 2005). De plus en plus d'études montrent que les macrophages résidents, qui sont présents dans les tissus en conditions physiologiques et dont le rôle est de phagocyter et d'éliminer les débris cellulaires et les molécules propres à l'organisme, ne dériveraient pas des monocytes circulants (Epelman, et al. 2014; Ginhoux, et al. 2010; Guilliams, et al. 2013). Par ailleurs, ces macrophages seraient capables de s'auto-régénérer, ce qui supporte l'hypothèse de la prolifération des macrophages *in vivo* (Cogle and Tarling 1984; Hashimoto, et al. 2013; Jenkins, et al. 2011; Sawyer 1986).

3.2 La polarisation *in vitro* des macrophages

Les macrophages sont des cellules « plastiques » qui peuvent acquérir différents phénotypes fonctionnels en réponse à divers stimuli environnementaux (Gautier and Yvan-Charvet 2014). Plusieurs sous familles de macrophages ont été décrites sur la base de l'expression de marqueurs de surface, de la production de facteurs spécifiques et de leurs fonctions biologiques (Colin, et al. 2014).

3.2.1 Les macrophages M1

La différenciation des macrophages pro-inflammatoires à activation « classique » ou M1 est induite par les cytokines de type Th1 telles que l'IFN γ (*interferon γ*) et le TNF, ainsi que par le lipopolysaccharide (LPS). Ces macrophages produisent de grandes quantités d'IL-12 et IL-23 et des quantités réduites d'IL-10. De plus, ils secrètent les cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-6 et IL-1 β (Verreck, et al. 2004). D'un point de vue fonctionnel, les macrophages M1 participent à l'élimination des pathogènes pendant l'infection, via le système de la

NADPH oxydase et leur activation chronique conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) générant le stress oxydant (Verreck, et al. 2004).

3.2.2 Les macrophages M2

La réaction inflammatoire est contrôlée de façon spatiale et temporelle par des processus anti-inflammatoires qui font intervenir les macrophages M2 à activation alternative. Quatre sous-populations de macrophages M2 ont déjà été décrites *in vitro* :

- Les macrophages de type M2a qui sont différenciés par les cytokines IL-4 et IL-13 produites par les lymphocytes Th2 et qui expriment fortement le récepteur au mannose (MR).
- La sous-population des macrophages M2b qui est induite par des complexes immuns en combinaison avec l'IL1 β et le LPS.
- Les macrophages M2c dont la différenciation est induite par l'IL-10 et le TGF β (*Transforming growth factor β*) ou les glucocorticoïdes, qui expriment fortement le MerTk (*Mer Receptor Tyrosine Kinase*) ce qui leur confèrent une capacité accrue à phagocyter les cellules apoptotiques, processus connu sous le nom d'efférocytose (Zizzo and Cohen 2013; Zizzo, et al. 2012).
- Enfin, les macrophages M2d qui sont induits suite à une co-stimulation avec des agonistes du récepteur de l'adénosine A_{2a} et du TLR (*Toll Like Receptors*), qui expriment des niveaux faibles de TNF et IL-12 mais qui produisent plus d'IL-10 et de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ce qui leur confèrent ainsi un profil pro-angiogénique. En revanche, à différence des autres macrophages M2, ils n'expriment pas le MR (Ferrante, et al. 2013; Grinberg, et al. 2009).

Tous ces différents sous-types de macrophages M2 sont caractérisés par une expression forte d'IL-10 et de TGF β et une expression diminuée d'IL-12. Les macrophages M2b font exception car ils sont également capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , IL-6 et TNF (Anderson, et al. 2002).

Les macrophages M2 sont impliqués dans le nettoyage de débris cellulaires et des cellules apoptotiques, grâce à leur forte capacité à phagocyter. De plus, ils participent à l'angiogenèse ainsi qu'à la réparation et au remodelage des tissus endommagés. Mosser et collègues (Mosser and Edwards 2008) ont proposé une nomenclature pour ces macrophages sur la base de leurs propriétés fonctionnelles. Les macrophages M2a sont appelés macrophages « réparateurs », les macrophages M2b regroupés avec les macrophages M2c, sont classifiés comme étant des macrophages « régulateurs ».

3.2.3 Les macrophages M ϕ 1 et M ϕ 2

L'utilisation des facteurs GM-CSF et M-CSF représente une autre façon de polariser les macrophages. Ils induisent respectivement les macrophages M ϕ 1 et les macrophages M ϕ 2 qui ont des propriétés équivalents à celles des macrophages M1 et M2, respectivement (Verreck, et al. 2004).

3.2.4 Les macrophages M4

Plus récemment, les macrophages M4, qui présentent un profil génique bien distinct des autres sous-types de macrophages, ont été décrits. Cette sous-population est induite par le CXCL4 (appelé aussi *platelet factor-4*) et montre une expression réduite de CD163, CD36 et MSR-1 (*macrophage scavenger receptor 1*). De plus, ils expriment certains marqueurs des macrophages M2 et M1 (Gleissner, Shaked, Erbel, et al. 2010; Gleissner, Shaked, Little, et al. 2010).

3.3 **Focus sur la polarisation alternative des macrophages**

3.3.1 La voie de signalisation de l'IL4 et de l'IL-13

Le travail qui fait l'objet de cette thèse a été effectué en utilisant des macrophages polarisés vers un phénotype M2a en présence d'IL-4. L'IL-4 est largement reconnue comme étant une cytokine anti-inflammatoire avec la capacité d'inhiber la production de TNF et d'IL-6 par les macrophages (Gordon and Martinez 2010). Elle est produite par de nombreuses cellules du système immunitaires telles que les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles de même que par les lymphocytes Th2 (Moro, et al. 2010; Neill, et al. 2010). L'IL-4 produit ses effets après liaison avec ses récepteurs qui sont principalement exprimés par les cellules hématopoïétiques mais également par des cellules non-hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes (Gordon and Martinez 2010). L'IL-4 peut stimuler deux types de récepteurs : le récepteur de type I qui est constitué par une chaîne alpha (IL-4R α 1) associé à la chaîne gamma du récepteur à l'IL2 (IL-2R γ) et le récepteur de type II qui est constitué par la même chaîne alpha (IL-4R α 1) associée à la chaîne alpha du récepteur à l'IL-13 (IL-13R α 1) (Figure 6). Les macrophages constituent un exemple de cellules qui expriment les deux types de récepteurs. La voie de signalisation activée par les deux types de récepteurs implique le facteur de transcription STAT6 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 6*) mais également d'autres membres de la famille STAT (Bhattacharjee, et al. 2006). STAT6 joue un rôle central dans la différenciation des lymphocytes Th2 et également dans la production des

IgE et des chimiokines au niveau de sites d'inflammation induite par une réaction allergique (Bhattacharjee, et al. 2006). Les macrophages M2a peuvent être polarisés aussi en présence de l'IL-13, cette interleukine agissant par liaison avec le récepteur de type II (IL-13R α 1) (LaPorte, et al. 2008). La voie de signalisation commune des deux cytokines (IL-4 et IL-13) implique la phosphorylation de STAT6, qui suite à la formation d'homodimères se déplace dans le noyau où il régule la transcription de ses gènes cibles (Gordon and Martinez 2010).

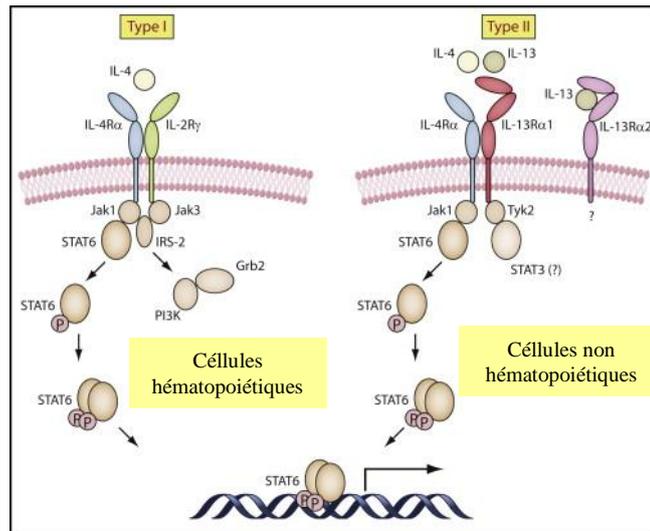


Figure 6. La voie de signalisation de l'IL-4 de Gordon S, Immunity 2010

3.3.2 Les marqueurs de la polarisation alternative chez l'homme et chez la souris

Bien que les propriétés des macrophages soient conservées entre les différentes espèces, leurs marqueurs de surface le sont beaucoup moins (Table 2). Par exemple, les macrophages M2 de souris sont définis par l'expression des marqueurs Ym1/2 (*chitinase 3-like protein 3*) et FIZZ1, qui ne possèdent pas d'homologue chez l'homme. Ym fait partie de la famille de molécules « *chitinase-like* » capables de reconnaître et lier le glucide chitine des nématodes et des helminthes (Reese, et al. 2007; Voehringer, et al. 2006). FIZZ1 est une protéine sécrétée qui se lie aux lymphocytes Th2 et qui conduit à l'inhibition de leur production de cytokines (Munitz, et al. 2008). Un autre marqueur propre aux macrophages M2 de souris est l'Arginase 1 (Arg1) qui souligne la spécificité du métabolisme de l'arginine pour les macrophages M2 murins, tandis que chez l'homme le métabolisme du tryptophane est plus marqué (Martinez, et al. 2006). De plus, l'arginase catalyse la production de polyamines nécessaires pour la synthèse du collagène, la prolifération cellulaire et le remodelage tissulaire (Hu, et al. 2012;

Van Dyken and Locksley 2013). Malgré l'existence d'un homologue de l'Arg1 chez l'homme, ce gène n'est pas du tout induit dans les macrophages humains stimulés avec l'IL-4 (Gordon and Martinez 2010).

Enfin récemment, un nouveau marqueur, la transglutaminase 2 (TGM2) a été décrit comme étant commun aux macrophages des deux espèces (Martinez, et al. 2013).

Marqueurs de la polarisation alternative chez l'homme et la souris		
Marqueurs	Souris	Homme
Arg1	+	
FIZZ1	+	
Ym1	+	
TGM2	+	+
AMAC1		+
MR (CD206)	+	+
CD163	+	+
Stabilin 1 (Stab1)	+	+
Selenoprotéine 1 (sepp1)	+	+
CD163L	+	+
Proplatelet basic protein (ppbp)	+	+
IL-1R antagonist (IL-1Ra)	+	+
IL-10	+	+
CD209a	+	
CD150		+

Table 2. Les marqueurs de la polarisation alternative chez l'homme et chez la souris, d'après Chinetti-Gbaguidi G, Current Opinion in Lipidology 2011

3.3.3 Les macrophages alternatifs en physiopathologie

En accord avec leurs propriétés réparatrices et prolifératives, les macrophages alternatifs M2 pourraient participer à des processus inflammatoires tels que l'obésité, le cancer, l'athérosclérose ou les infections.

L'**obésité** induit un état d'inflammation chronique qui contribue à la résistance à l'insuline et au développement du diabète de type 2. Parmi les cellules impliquées dans cette réponse inflammatoire, les macrophages qui infiltrent le tissu adipeux ou ATM (*Adipose Tissue Macrophages*) jouent un rôle pertinent. Chez l'homme ainsi que chez la souris, le nombre d'ATM augmente avec la prise de poids et la résistance à l'insuline (Cancello, et al. 2005; Xu, et al. 2003). Les ATM sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α , qui bloquent l'action de l'insuline au niveau des adipocytes ce qui pourrait représenter un lien potentiel entre l'inflammation et le diabète (Weisberg, et al. 2003). Lumeng et

collègues ont par la suite démontré que l'obésité induit une transition phénotypique des macrophages M2 vers un profil pro-inflammatoire M1, avec pour conséquence la perte de leurs actions protectrices (Lumeng, et al. 2007). En absence d'inflammation, les ATM ont un phénotype similaire aux macrophages M2, ils expriment tous les marqueurs de la polarisation alternative tels que MR, AMAC1 (*Alternative Macrophage Activation-Associated CC chemokine 1*) et CD163. En parallèle, ils conservent la capacité à produire des molécules pro-inflammatoires parfois même en quantités supérieures aux macrophages M1 ; pour cette raison ils sont appelés « macrophages à phénotype mixte » (Zeyda, et al. 2007). Plus récemment, il a été démontré que les ATM issus du tissu adipeux de souris obèses présentent une expression accrue des molécules pro-inflammatoires alors que les ATM issus de souris minces possèdent plutôt des caractéristiques proches des macrophages M2 (Kosteli, et al. 2010; Red Eagle and Chawla 2010). Cependant, chez l'homme, des analyses conduites sur le tissu adipeux sous-cutané et viscéral de patients obèses ont mis en évidence que les ATM n'expriment pas les marqueurs M1. Ces données suggèrent que les ATM n'adoptent pas le phénotype à activation classique M1 (Kratz, et al. 2014).

Les macrophages peuvent également infiltrer aussi les **tumeurs** en participant à la création d'un environnement inflammatoire (Mantovani, et al. 1992). Ces macrophages, appelés TAM (*Tumor Associated Macrophages*) sont guidés vers la tumeur par des chimiokines, et sont capables de produire des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques, ainsi que des protéases. De ce fait, ils promeuvent la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la métastase (Mantovani, et al. 1992). L'analyse des fonctions et des marqueurs de surface de ces macrophages indique qu'ils présentent majoritairement un phénotype alternatif (Mantovani, et al. 2002). De plus, ils produisent des molécules pro-inflammatoires telles que TNF α , IL-1 β et IL-6 (Ueno, et al. 2000). A l'origine du phénotype des TAM il semble y avoir la voie de signalisation IRF3 (*interferon regulatory factor 3*)/STAT1, ce qui justifierait l'expression des chimiokines induite par l'IFN γ et associées au phénotype M2 (IL-10^{elevé} IL-12^{diminué}) (Biswas, et al. 2006).

Dans la phase aïgue d'une **infection bactérienne**, comme celle provoquée par le *Leishmania* ou le *Plasmodium*, les macrophages M1 interviennent pour contrôler la parasitose et favoriser une réponse dépendante de l'IFN γ (Walther, et al. 2006). Cependant, une réponse immune du type Th2 peut également se développer en fonction du stade de l'infection ou de la virulence du parasite. Dans ce cas, les macrophages subissent une activation alternative qui se traduit par une prévention des dommages aux tissus (Noel, et al. 2002).

3.4 Effet et conséquences de la polarisation sur le métabolisme intracellulaire des macrophages

La reprogrammation du métabolisme intracellulaire est nécessaire pour que les macrophages se polarisent et fonctionnent correctement. De plus, le métabolisme des macrophages subit lui-même des changements suite aux processus de polarisation.

Les macrophages sont des cellules à métabolisme essentiellement glycolytiques (Newsholme, et al. 1987). Cependant, leur activation et polarisation provoque des changements dans le métabolisme du glucose dans le but de répondre aux nouveaux besoins fonctionnels et immunitaires (Rodriguez-Prados, et al. 2010; Rosa, et al. 1992; Traves, et al. 2012; Wu, et al. 1991). Les macrophages M1 induits par l'IFN γ et/ou les ligands de TLR montrent un métabolisme plutôt de type glycolytique/anaérobie : ils consomment plus de glucose et libèrent plus de lactate, ce qui est essentiel pour répondre rapidement à la nécessité de produire des précurseurs pour la synthèse des protéines pro-inflammatoires. Un travail publié plus récemment (Haschemi, et al. 2012) a au contraire mis en évidence que les macrophages M1 induits par le LPS consomment moins d'oxygène et acidifient plus l'environnement extracellulaire, démontrant que la polarisation M1 provoque un changement du métabolisme vers celui glycolytique aérobie. D'autre part, les macrophages M2 induits par l'IL-4 utilisent l'oxydation du glucose pour produire l'énergie nécessaire à la réparation et au remodelage des tissus (Odegaard and Chawla 2011).

Le métabolisme lipidique a aussi des répercussions sur les fonctions des macrophages, en particulier sur le processus de phagocytose : en fait, les lipides contribuent au maintien énergétique et participent à la régulation de la fluidité de la membrane, ce qui a des conséquences dans la formation du phagosome (Mukundan, et al. 2009). Les acides gras représentent une des sources d'énergie utilisée par les macrophages (Newsholme, et al. 1996; Simon, et al. 1973). Chez la souris, les macrophages M2 activés par l'IL-4 présentent une augmentation de l'accumulation et de l'oxydation des acides gras alors que ces phénomènes sont supprimés dans les macrophages M1 (Odegaard and Chawla 2011).

Chez l'homme, des analyses d'expression génique mettent en évidence des changements dans la régulation de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme des sphingolipides et des céramides au cours de la polarisation des macrophages (Martinez, et al. 2006). De plus, au sein de la lésion d'athérosclérose, loin du cœur lipidique, on retrouve des macrophages alternatifs CD68+MR+ qui contiennent des gouttelettes lipidiques plus petites que les macrophages CD68+MR-. D'ailleurs, les macrophages M2 différenciés *in vitro* en présence

d'IL-4 montrent une altération du métabolisme et de l'efflux du cholestérol ainsi la polarisation alternative diminue la susceptibilité des macrophages à se transformer en cellules spumeuses (Chinetti-Gbaguidi, et al. 2011).

3.5 La polarisation des macrophages dans l'athérosclérose *in vivo*

Les phénotypes des macrophages présents dans la plaque d'athérosclérose reflètent et même amplifient l'hétérogénéité observée *in vitro*. Pour cette raison, j'ai choisi de leur dédier un chapitre à part. Au delà de la dichotomie M1-M2, il apparaît de plus en plus évident au fil du temps que plusieurs populations de macrophages existent *in vivo*, influencées surtout par la grande complexité de la composition de la plaque d'athérosclérose (Figure 7).

3.5.1 Les phénotypes induits par les lipides

Dans la plaque d'athérosclérose on retrouve des dépôts de lipides et de leurs dérivés oxydés ; dans les stades précoces de la lésion, des cristaux de cholestérol s'accumulent et constituent un stimulus pro-inflammatoire pour les macrophages (Düwell, et al. 2010). De plus, les LDL oxydées ainsi que les esters de cholestérol reconnaissent le TLR4 et induisent la polarisation M1 (Fang, et al. 2010). Cependant, il existe d'autres dérivés du cholestérol, tel que le 9-oxononanoïl-cholestérol (Sottero, et al. 2005) et les dérivés de l'acide linoléique (Hughes, et al. 2008) qui induisent une polarisation M2 avec respectivement une production accrue de TGF β et d'IL-10. Enfin, les métabolites des sphingolipides promouvraient un changement phénotypique des macrophages M1 en macrophages M2 (McCarthy, et al. 2013). De plus, les phospholipides oxydés seraient capables d'induire la différenciation des macrophages Mox qui sont caractérisés par une capacité réduite à phagocyter, associée à l'expression des gènes du métabolisme oxydatif tels que l'*heme-oxygenase 1* (Hmox1) ainsi qu'à l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et la cyclooxygénase 2. Dans les lésions athérosclérotiques avancées chez la souris, les macrophages Mox constituent environ le 30% du nombre total de macrophages, alors que leur présence dans les lésions humaines reste à vérifier (Kadl, et al. 2010).

3.5.2 Les phénotypes induits par l'hémorragie et le fer

L'hémorragie est un phénomène typique de la plaque causée par la rupture de vaisseaux intra-plaque et qui conduit à une grosse accumulation d'érythrocytes et, par conséquence, de fer au sein de la lésion. Les macrophages peuvent phagocyter des quantités importantes de fer et d'érythrocytes sénescents, ce qui entraîne leur polarisation vers un phénotype M(Hb) (Finn, et al. 2012) et Mhem (Boyle, et al. 2012). Les macrophages M(Hb) expriment le récepteur au mannose MR et le CD163, récepteur du complexe haptoglobine-hémoglobine (Nielsen, et al. 2010). De plus, ces macrophages sont protégés contre l'accumulation de lipides car ils expriment fortement le récepteur nucléaire LXR (*Liver X Receptor*) (Finn, et al. 2012), facteur de transcription impliqué dans la promotion de l'efflux du cholestérol des macrophages (Rigamonti, et al. 2005). Par ailleurs, les macrophages Mhem induits par l'hème, qui se lie au fer, expriment de façon importante LXR β en plus du gène codant pour Hmox-1 ce qui leur confèrent une protection *vis à vis* du stress oxydatif et de l'accumulation de lipides (Boyle, et al. 2012; Boyle, et al. 2011). Il est fort probable que ces deux sous-populations de macrophages existent dans la plaque et que leurs phénotypes évoluent en relation avec la progression de la lésion. Une population de macrophages CD68+MR+ a été identifiée dans les zones de neovascularization (Bories, et al. 2013). *In vitro*, les macrophages M2 montrent une plus forte capacité à capter et accumuler le fer par rapport aux macrophages non polarisés RM. De plus, ces macrophages M2 ont une capacité accrue à phagocyter les érythrocytes sénescents. Cependant, lorsque les macrophages M2 sont chargés en fer, leur phénotype change et pour prévenir les dommages liés au stress oxydant, ils augmentent l'élimination du fer en excès via un mécanisme LXR α /Nrf2 dépendant (Bories, et al. 2013).

3.5.3 Les phénotypes induits par les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance

Un autre exemple de sous-population de macrophages qu'on retrouve au sein de la plaque humaine, est représenté par les macrophages M4, qui répondent à la chimiokine CXCL4. Ces macrophages expriment la MMP7 (Erbel, et al. 2014; Pitsilos, et al. 2003). Parmi les cytokines qui polarisent les macrophages *in vivo*, l'IL-4 a été détectée dans les zones de la lésion d'athérosclérose humaine enrichies par les macrophages CD68+MR+, ce qui suggère que cette cytokine pourrait être un inducteur de la polarisation M2 *in vivo* (Chinetti-Gbaguidi, et al. 2011). Le GM-CSF et M-CSF se retrouvent aussi *in vivo*. Le M-CSF est exprimé dans les artères saines ainsi que dans les lésions athérosclérotiques, alors que le GM-CSF est très peu exprimé en conditions physiologiques mais son expression augmente lors du développement de l'athérome (Brocheriou, et al. 2011; Xu, et al. 2007). La prédominance du

M-CSF dans les lésions précoces induirait le phénotype M2 des macrophages, tandis que le GM-CSF, qui apparaît plus tardivement, induirait le phénotype M1 (Plenz, et al. 1999).

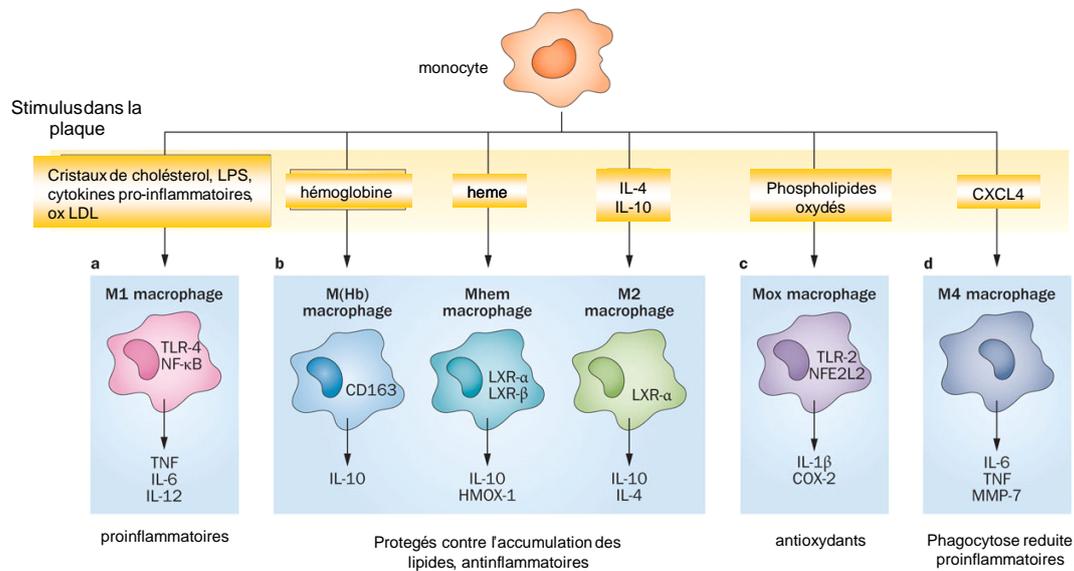


Figure 7 . Les principaux phénotypes de macrophages dans la lésion d'athérosclérose d'après Chinetti-Gbaguidi G, Nat Rev Cardiol 2015

3.6 La distribution des macrophages dans la lésion d'athérosclérose et la transition phénotypique

Le nombre total des macrophages augmente progressivement avec l'avancement de la lésion (Cho, et al. 2013; Shaikh, et al. 2012; Stoger, et al. 2012). D'ailleurs, les macrophages M1 et M2 se localisent dans des zones différentes de la plaque, ce qui pourrait avoir une conséquence au niveau de la stabilité de la plaque. Les macrophages M1 sont présents principalement dans le cœur lipidique tandis que dans la chape fibreuse qui l'entoure on retrouve les deux phénotypes en proportion équivalente (Stoger, et al. 2012). Ceci suggère que les macrophages M2 joueraient un rôle bénéfique profibrotique et stabilisant pour la plaque en contrecarrant l'action délétère des M1 (Lee, et al. 2001). Des évidences de colocalisation des marqueurs M1 et M2 dans certaines zones de la plaque existent, alors que dans d'autres zones on retrouve exclusivement un seul sous-type de macrophage.

Cette distribution des différents types de macrophages pourrait être le résultat de trois mécanismes potentiels: les sous-populations de macrophages sont issues de la différenciation de sous-types de monocytes bien distincts; deuxièmement, les macrophages M1 et M2 pourraient être recrutés progressivement et en décalage spatial et temporel; enfin, troisième possibilité, les macrophages subissent un changement phénotypique en réponse aux stimuli

environnementaux. L'observation que le type de cytokines présentes dans la plaque change au cours de la progression de la lésion, avec une expression accrue de l'IFN γ au détriment de l'IL-4 dans les plaques avancées soutient la troisième hypothèse (Khallou-Laschet, et al. 2010). Cette transition phénotypique est aussi observée dans des modèles de régression de la lésion, où après transplantation de la plaque d'athérosclérose d'une souris hyperlipidémique à une souris normolipidémique, la présence de marqueurs M1 diminue en faveur de marqueurs M2, phénomène qui contribuerait à résoudre l'inflammation (Feig, Parathath, et al. 2011; Feig, et al. 2012).

3.7 Les modulateurs du phénotype des macrophages

Par le terme « modulateurs », il faut entendre tous les facteurs et molécules qui peuvent réguler, induire ou simplement influencer le phénotype des macrophages et leur éventuel « switch » phénotypique entre M1 et M2. Ces facteurs sont nombreux et diversifiés. Parmi eux, on peut citer les microRNA (miRNA) tels que miRNA155 (Nazari-Jahantigh, et al. 2012) et miRNA 147 (Liu, et al. 2009), les HDL chez la souris (Feig, Rong, et al. 2011; Sanson, et al. 2013), les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription, tels que PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) γ et PPAR δ (chez la souris) (Bouhleb, et al. 2007; Gallardo-Soler, et al. 2008; Kang, et al. 2008; Odegaard, et al. 2008), KLF (*Kruppel-like factor*) 4 (Liao, et al. 2011) et KLF6 (Date, et al. 2014), Rev α (NR1D1) (Ma, et al. 2013) ainsi que les membres de la famille NR4A qui seront traités plus en détail dans le chapitre 5. D'autres exemples de modulateurs sont représentés par la Thioredoxine (Trx), protéine impliquée dans le stress oxydatif (El Hadri, et al. 2012), l'antibiotique Rapamycine (Mercuri, et al. 2013) et sa voie de signalisation mTOR (Byles, et al. 2013), les irradiations (Gabriels, et al. 2014) et les infections causées par le parasite helminthe (Cudejko, et al. 2011). Tous ces facteurs ainsi que les mécanismes impliqués dans la modulation des phénotypes des macrophages sont décrits dans un article de synthèse publié dans la revue « Circulation Journal » et inclus dans la section « annexes » de ce manuscrit.

4. LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

4.1 Généralités

Les récepteurs nucléaires (RN) sont des facteurs de transcription qui, en se liant à l'ADN, contrôlent multiples phénomènes tels que le développement, la différenciation, la mort cellulaire et le métabolisme. Malgré leur différence, l'évolution les rassemble dans une seule grande famille constituée des 48 gènes chez l'homme (Germain, et al. 2006; Gronemeyer, et al. 2004).

4.2 La nomenclature

Les études phylogéniques ont permis d'organiser la grande famille des récepteurs nucléaires en 6 sous-familles qui ont été à leur tour divisées en 28 groupes. Toutefois, c'est en 1999 que la NC-IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*) a approuvé une nouvelle nomenclature qui classe toutes les sortes de récepteurs nucléaires. Elle se base sur le système établi par Daniel W. Nebert et ses collègues: tous les récepteurs nucléaires sont identifiés par deux lettres « NR » (pour *nuclear receptor*) suivies par un numéro qui représente la sous-famille à laquelle le récepteur nucléaire appartient puis une lettre majuscule pour le groupe et un dernier numéro pour le gène (Gronemeyer, et al. 2004). Par exemple, le *Neuron-derived orphan receptor 1*, dont je parlerai ensuite, appartient à la sous-famille IV, groupe A et il a été le troisième à être décrit ; pour cette raison il est aussi appelé NR4A3.

4.3 L'organisation en domaines fonctionnels

Les récepteurs nucléaires ont une organisation structurale commune caractérisée par 5 domaines (Figure 8).

1. Domaine A/B : il se situe à l'extrémité aminique (Nter) et contient une fonction de transactivation indépendante de la présence de ligands ou *activation function* AF-1. En étant très variable en longueur ainsi qu'en séquence, les différentes isoformes qui en dérivent montrent la capacité d'interagir avec plusieurs co-facteurs : SRCs (*steroid receptor coactivators*), p300 et CBP (*CREB-binding protein*) (Hittelman, et al. 1999). Ce domaine est aussi affecté par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation (Katagiri, et al. 2000) et la SUMOylation.

2. Domaine C ou DBD : il est le plus conservé et est constitué par le domaine de liaison à l'ADN (*DNA binding domain*, DBD) au niveau des séquences spécifiques appelées éléments de réponse aux RN (NRRE, *nuclear receptor responsive elements*) (Rastinejad, et al. 1995). Ce domaine contient deux hélices alpha avec la structure en doigts de zinc « Zinc Fingers » dont l'appellation rappelle le ion Zn^{2+} couplé aux 4 résidus aminoacidiques de cystéine. L'hélice 1 qui contient une courte séquence d'acides aminés appelée «boîte P » (*Proximal box*) prend contact direct avec le demi-site du NRRE (Umesono, et al. 1991). L'hélice 2 contient également une courte séquence de 5 acides aminés appelée « boîte D » (*Distal box*) qui permet la dimérisation du RN et la reconnaissance de deux demi-sites et l'espace qui est présent entre eux (Zechel, et al. 1994).
3. Domaine D : situé entre le DBD et le domaine de liaison au ligand (*Ligand binding domain*, LBD), il est assez flexible et contient le signal pour la localisation nucléaire (NLS). Ce domaine peut aussi servir pour l'interaction avec des co-répresseurs tels que N-CoR (*Nuclear receptor corepressor*) (Liu, et al. 2008) et il participe à l'interaction avec le partenaire d'homo ou d'hétéro-dimérisation.
4. Domaine E ou LBD : Le domaine le plus grand est cependant constitué par celui de liaison au ligand (LBD) qui est près de l'extrémité carboxylique du récepteur et dont la structure secondaire est composée par 12 hélices alpha. Le LBD contient une poche hydrophobe pour accueillir le ligand, il présente aussi une surface pour l'homo et l'hétéro-dimérisation. Enfin, l'hélice 12 héberge la deuxième fonction de trans-activation indépendante de la présence de ligands ou AF-2.
5. Domaine F : situé à l'extrémité carboxylique (Cter), ce domaine constitué par 80 acides aminés possède une séquence très variable, et aussi pour cette raison très peu d'informations sont connues concernant sa fonction et son rôle. Cependant, cette région est impliquée dans l'interaction avec les co-facteurs ; c'est le cas pour ER (*Estrogen Receptor*) (Kim, et al. 2003), HNF4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4*) (Ruse, et al. 2002; Sladek, et al. 1999) et RARalpha (*Retinoid Acid Receptor alpha*) (Farboud and Privalsky 2004).



Figure 8. Structure et organisation fonctionnelle des RN, d'après Sladek M, *Molecular & Cellular Endocrinology* 2011

4.4 Le mécanisme d'action

Selon les hypothèses plus accréditées, le mécanisme d'action des récepteurs nucléaires se déroule en trois étapes: la répression, la dérépression et enfin l'activation de la transcription.

4.4.1 La répression

En l'absence de ligand ou parfois en présence d'un antagoniste, le récepteur nucléaire inhibe la transcription de ses gènes cibles car il recrute des **co-répresseurs** (Figure 9). Parmi les plus connus, nous pouvons citer NCoR (*Nuclear Receptor CoRepressor*) et SMRT (*Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors*) qui ont été pour la première fois étudiés pour leur capacité à interagir avec le récepteur aux hormones rétinoïdiennes et thyroïdiennes (Chen and Evans 1995; Horlein, et al. 1995). Cependant, les co-répresseurs n'agissent pas seuls ; ils peuvent former des grands complexes avec des protéines HDAC (*Histone deacetylases*) capables d'exercer notamment une action de déacétylation des histones (*histone deacetylase activity*); cette étape est appelée répression. Le statut hypo-acétylé confère une forte charge positive aux histones qui seront par conséquent très fortement associés à l'ADN chargé négativement. Le résultat est une faible accessibilité du génome aux facteurs de transcription (McKenna, et al. 1999).

4.4.2 La de-répression

Lors que le ligand se lie, le récepteur nucléaire remplace le complexe de co-répresseurs avec des **co-activateurs** (Figure 9). Parmi les premiers co-activateurs à être recrutés il y a les membres de la famille p160 qui servent ensuite de plate-forme pour le recrutement de CBP (CREB-binding protein) et p300. Ceux-ci interagissent par la suite avec p/CAF (CBP/p300-associated factor) qui montre la capacité d'acétyler les histones (HAT, *Histone acetyltransferase*) (Rosenfeld and Glass 2001). Ce processus, connu sous le nom de « dé-répression », entraîne la décondensation de la chromatine car les histones perdent leur charge positive et ils se séparent de l'ADN. Ainsi les promoteurs des gènes deviennent accessibles aux facteurs de transcription.

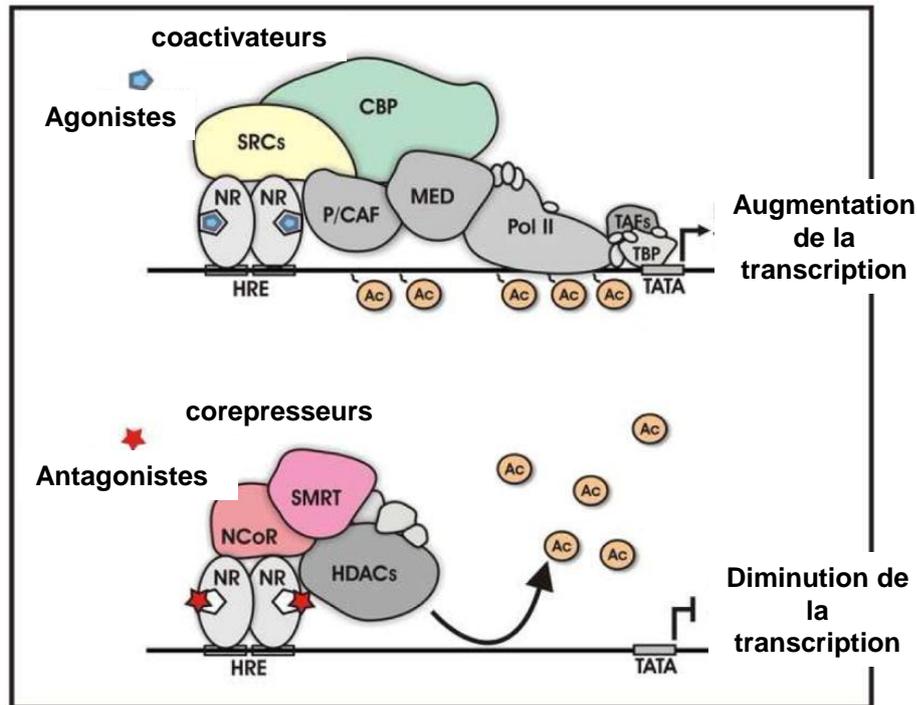


Figure 9. Modèle d'assemblage des co-activateurs et co-répresseurs d'après Auger AP, J. Psyneuen 2009. En haut : les agonistes se lient aux récepteurs nucléaires qui s'associent aux co-activateurs et aux protéines additionnelles, ceci conduit à une augmentation de la transcription des gènes. Les co-activateurs induisent la transcription des gènes via l'acétylation des histones et le recrutement et la stabilisation du complexe transcriptionnel. En bas : les antagonistes se lient aux récepteurs nucléaires qui sont associés aux co-répresseurs et aux protéines additionnelles. Les co-répresseurs répriment l'expression des gènes *via* la désacétylation des histones.

4.4.3 L'activation de la transcription

Toutefois, le recrutement de ces co-facteurs n'est pas suffisant pour l'activation de la transcription des gènes cibles. En fait, dans la dernière étape, le complexe à activité HAT est probablement acétylé et cela diminue l'interaction avec le récepteur nucléaire au point qu'il est remplacé par un deuxième complexe de co-activateurs (TRAP/DRIP/ARC) appelé SMCC. Le complexe SMCC est enfin capable d'interagir avec tout le système de transcription entraîné notamment par l'ARN polymérase II, et cela amène à l'activation de la transcription des gènes cibles (Germain, et al. 2003; Robinson-Rechavi, et al. 2003). Le démarrage de la transcription consiste en l'avancée de l'ARN polymérase II au delà d'une quinzaine de nucléotides. La transcription démarre quelques nucléotides en aval de la boîte TATA (*TATA box*) au site d'initiation de la transcription (+1). La boîte TATA permet une initiation précise de la transcription (Kornberg 2005).

4.5 L'activité des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires sont dans la plupart des cas des protéines cytoplasmiques associées à d'autres protéines appelées chaperonnes. La liaison du ligand provoque la dissociation du RN de la protéine chaperonne et sa migration dans le noyau. Cependant, il existe aussi des RN sous forme nucléaire qui s'associent ou pas à l'ADN en absence de leur ligand. En général, les RN peuvent activer ou réprimer la transcription de leurs gènes cibles selon leur interaction avec les co-activateurs et co-répresseurs.

4.5.1 Trans-activation et cis-activation

Certains auteurs soulignent la différence subtile entre les phénomènes de trans-activation et de cis-activation (Jeoung, et al. 2007). La cis-activation est décrite comme le processus d'activation du récepteur nucléaire par son propre ligand, par contre la trans-activation consisterait en l'activation d'un RN lié à son ligand par un autre RN non associé au ligand (Figure 10) ; un exemple est donné par LHR (*LH/CG receptor*) (Ji, et al. 2002).

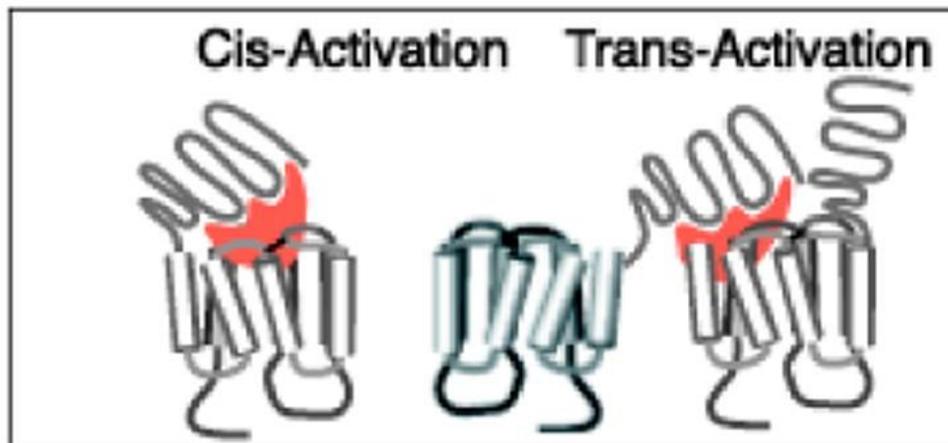


Figure 10. Représentation schématique des phénomènes de cis- activation et trans-activation proposés par Jeoung M et al (Jeoung M. *Molecular Cellular Endocr* 2007). On parle de cis-activation lorsque l'exodomaine du récepteur nucléaire complexé au ligand (montré en rouge dans la figure) module son propre endodomaine. On parle de trans-activation lorsque l'exodomaine complexé au ligand module un autre récepteur qui n'est pas associé au ligand.

4.5.2 Trans-répression

Certains récepteurs nucléaires peuvent réprimer la transcription de leurs gènes cibles sans se fixer directement à l'ADN mais plutôt par interaction avec d'autres facteurs de transcription selon un mécanisme de « tethering ». Ce processus est connu sous le nom de trans-répression et intéresse principalement les facteurs de transcription NFκB (*Nuclear Factor κB*), AP-1 (*Activator Protein 1*), STAT et NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cells*) (Delerive, De

Bosscher, et al. 1999b; Jonat, et al. 1990; Ricote, et al. 1998; Schule, et al. 1991; Yang, et al. 2000). Plusieurs travaux publiés décrivent l'interaction de PPAR α (Delerive, De Bosscher, et al. 1999b) et ER (De Bosscher, et al. 2003; Ray and Prefontaine 1994) avec NF κ B et plus particulièrement avec la sous-unité p65, ce qui empêche la transcription des gènes de l'inflammation. Le fait que l'interaction avec NF κ B se fasse par le domaine conservé RHD laisse penser que les RN pourraient interférer avec l'activité de tous les membres de la famille NF κ B. Un mécanisme similaire est impliqué dans la trans-répression des RN par les sous-unités Jun/Fos qui constituent AP-1 et qui amène à la formation d'un complexe qui ne lie plus l'ADN ou qui empêche la conversion dans la forme compétente pour l'élongation de l'ARN messager. Parmi ces RN, nous pouvons citer GR (*Glucocorticoid Receptor*) (Jonat, et al. 1990; Schule, et al. 1991; Yang-Yen, et al. 1990), AR (*Androgen Receptor*) (Bubulya, et al. 1996), RAR (*Retinoid Acid Receptor*) (Shemshedini, et al. 1991); PPAR (Delerive, De Bosscher, et al. 1999a; Delerive, Martin-Nizard, et al. 1999), ER (Diefenbacher, et al. 2008). La trans-répression peut avoir lieu aussi par SUMOylation du RN. C'est le cas de PPAR γ et LXR α qui en interagissant avec NF κ B ou NCoR et en interrompant le processus de dégradation *via* le protéasome, permettent la rétention des co-répresseurs au niveau du promoteur des gènes (Ghisletti, et al. 2007; Pascual, et al. 2005).

Enfin, la diminution de l'expression des facteurs et des récepteurs membranaires ainsi que l'inhibition de la translocation dans le noyau de certains facteurs de transcription contribuent à cette trans-répression.

4.6 Les facteurs modulant l'activité des récepteurs nucléaires

Nous avons déjà discuté dans la section sur le mécanisme d'action, la possibilité que l'activité des RN soit modulée par des co-répresseurs et des co-activateurs. Cependant, ceux-ci ne sont pas les seuls facteurs impliqués dans cette régulation. Le niveau d'expression des RN joue aussi un rôle ; en effet, il peut varier selon le type cellulaire et en fonction de l'environnement de la cellule. Par la suite, trois facteurs seront traités plus en détails : la liaison à l'ADN, l'activation par les ligands et les modifications post-traductionnelles.

4.6.1 La liaison à l'ADN

Les RN reconnaissent des séquences spécifiques situées dans les promoteurs des gènes cibles et appelées NRRE. Ces séquences sont constituées par un ou deux demi-sites composés de six nucléotides et ils peuvent adopter différentes géométries ; la séquence palindromique peut être directe (DR), retournée (ER) ou inversée (IR), séparée par une séquence dont le nombre de nucléotides est variable. Ces NRRE peuvent présenter des variations considérables par rapport à la séquence consensus du RN, ce qui peut diminuer l'affinité de la liaison à l'ADN et par conséquent atténuer la réponse transcriptionnelle. Par ailleurs, il existe des éléments de réponse mixtes qui peuvent être reconnus par des facteurs différents (Forman, et al. 1994). Pour cette raison, il est possible que des réponses différentes se produisent à partir d'un même site selon la combinaison des facteurs qui sont liés (Nakshatri and Bhat-Nakshatri 1998; Sanguedolce, et al. 1997).

4.6.2 L'activation par les ligands agonistes et antagonistes

Une grande variété de molécules peut se lier et activer les récepteurs nucléaires. D'une façon générale, ces ligands sont de molécules de petites tailles, hydrophobes et liposolubles. Parmi les ligands endogènes on trouve les hormones stéroïdiennes, la vitamine D, les acides biliaires, les prostaglandines, les acides gras et autres métabolites du cholestérol. Tous ces ligands sont accueillis dans la poche de liaison au ligand qui permet, si elle est de grande dimension, l'interaction avec plusieurs métabolites différents avec une basse affinité. En revanche, si la poche est de dimension réduite elle peut reconnaître seulement des ligands très spécifiques avec une forte affinité. Les ligands peuvent être classifiés en plusieurs types selon leur capacité à interagir avec l'hélice 12 du AF-2. Les ligands « agonistes » peuvent se fixer directement à l'hélice 12 du AF-2 et la stabiliser dans une conformation active ou en induire une modification qui favorise une interaction plus stable avec d'autres hélices. D'autre part, les ligands « antagonistes » ont la capacité d'occuper le LBD et cela empêche l'interaction avec l'agoniste, du fait que l'hélice 12 n'assume pas sa conformation active. De plus, cette dernière peut être stabilisée par l'antagoniste dans une cavité hydrophobique qui empêcherait la fixation des co-activateurs (Germain, et al. 2006).

4.6.3 Modifications post-traductionnelles

L'activité des récepteurs nucléaires peut être contrôlée par des modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles la principale semble être la phosphorylation qui affecte quasiment toutes les étapes de fonctionnement d'un RN et implique une grande variété de

kinases (Rochette-Egly 2003). La SUMOylation (*Small ubiquitin-like modification*), une modification covalente qui voit la conjugaison d'un peptide de 101 acides aminés appelé SUMO à un résidu de lysine dans la protéine cible, peut également affecter la stabilité et la localisation du RN et néanmoins en moduler l'activité d'une façon positive ou négative (Geiss-Friedlander and Melchior 2007). Un autre exemple est constitué par l'ubiquitination : un peptide très conservé est lié au RN d'intérêt via une cascade de réactions enzymatiques et il en entraîne la dégradation par le protéasome (Santner and Estelle 2010). Ce processus est certainement impliqué dans la régulation de la demie-vie du RN et aussi dans la détermination de sa localisation subcellulaire. Enfin, la O-GlcNAcylation consiste dans la liaison d'une N-acétylglucosamine à un résidu de sérine et thréonine ; cette modification est proportionnelle à la quantité de glucose intracellulaire et est influencée par le stress, les hormones ou les nutriments (Love and Hanover 2005; Zeidan and Hart 2010).

4.7 Les récepteurs orphelins

Dans la grande famille de récepteurs nucléaires, il en existe certains pour lesquels aucun ligand a été découvert à ce jour; pour cette raison ils sont appelés « Orphelins ». Le tout premier à être identifié comme appartenant à cette classe est le ERR (*Estrogen Related Receptor*) (Giguere, et al. 1988) qui a une séquence très similaire au récepteur aux estrogènes (ER) mais n'est pas lié ni activé par les estrogènes. Ce n'est pas clair si ces récepteurs nucléaires sont orphelins car leur conformation empêche la liaison avec un ligand ou parce que pour l'instant la découverte d'une molécule capable de les lier n'a pas encore été faite. Toutefois, les récepteurs nucléaires orphelins répondent très bien à toutes molécules chimiques externes à l'organisme regroupées sous le nom de xénobiotiques, telles que les aliments, les polluants, les agents carcinogènes et qui sont métabolisés et éliminés par les membres de la famille des cytochromes (CYP). Ces RN peuvent être activés par les xénobiotiques et peuvent réguler l'expression des gènes codants pour les CYP. C'est le cas de SXR (*Steroid and Xenobiotic Receptor*) et son orthologue chez les rongeurs PXR (*Pregnane X Receptor*). Pour cette raison, ils ont été décrits comme capable de servir d'interface entre le génome humain et l'environnement extérieur (Xie and Evans 2001). La recherche de ligands est très active et a permis d'en identifier pour les PPARs, PXR et CAR (*Constitutive Androstane Receptor*). A la différence des récepteurs nucléaires classiques de haute affinité, ces derniers lient les ligands avec une affinité basse et montrent une spécificité assez large. Ils sont donc appelés « senseurs » de l'état physiologique de l'organisme, comme par exemple la quantité d'acides gras et cholestérol (Chawla, et al. 2001; Lee, et al. 2003). Pourtant, des vrais

récepteurs nucléaires orphelins existent ; c'est le cas de HNF4 pour lequel la liaison du ligand tel qu'un acide gras n'a aucun effet sur son activité mais fonctionne plutôt comme un group prosthétique. Un autre exemple est constitué par $ERR\gamma$ et LRH1 (*Liver Receptor Homologous Protein 1*) qui possèdent un domaine de fixation au ligand qui dans l'état non lié est dans une conformation déjà active ; en revanche, il peut accueillir un antagoniste qui après fixation, déstabilise l'hélice 12 et empêche l'interaction avec les co-activateurs (Gronemeyer, et al. 2004). Un dernier exemple est constitué par les trois membres de la famille NR4A dont la poche pour le ligand potentiel est occupée par les grandes chaînes latérales des acides aminés hydrophobes. Dans le cas où un ligand pour ces récepteurs existerait, sa liaison provoquerait une réorganisation de la structure des récepteurs dans le but de créer une cavité prête à l'accueillir (Baker, et al. 2003; Wang, et al. 2003).

5. LA SOUS FAMILLE NR4A

5.1 La découverte

Parmi les récepteurs nucléaires orphelins on peut citer la sous-famille NR4A, constituée de trois membres : NR4A1 (connu aussi sous l'appellation de Nur77, NGFI-B ou TR3), NR4A2 (connu aussi comme Nurr1, RNR1 ou NOT) et NR4A3 (aussi appelé NOR1, MINOR ou TEC).

Nur77 (*Neuron-derived clone 77*) a été le premier membre à être identifié comme gène induit par le NGF (*Nerve Growth Factor*) dans la lignée cellulaire de phéochromocytomes de rat PC12 (Milbrandt 1988) ainsi que par le sérum dans des fibroblastes de souris (Hazel, et al. 1988). Nurr1 (*Nuclear receptor related 1*) a été initialement isolé à partir de cerveaux de souris (Law, et al. 1992). Comme Nur77, son expression est induite par une dépolarisation des membranes dans la lignée cellulaire de phéochromocytome de rat PC12. Cependant il est décrit comme un facteur de transcription spécifique du cerveau, associé au développement des neurones dopaminergiques (Zetterstrom, et al. 1997). Enfin NOR1 (*Neuron derived Orphan Receptor 1*), a été identifié pour la première fois en 1994 par Ohkura et collègues dans des cellules neuronales primaires de rat subissant l'apoptose (Ohkura, et al. 1994). NOR1 a été également isolé à partir d'une librairie d'ADNc de lymphocytes T humains activés par du PHA (phytohéماغglutinine), un agent mitogène qui stimule la prolifération de ces cellules. Le rôle de NOR1 dans la prolifération cellulaire a ainsi été démontré, d'où l'origine de son autre appellation MINOR pour «mitogen-inducible nuclear receptor» (Hedvat and Irving 1995).

5.2 La structure

Les trois gènes montrent une forte similarité au niveau de leur séquence, ce qui suggère que les trois RN ont évolué d'un gène ancestral commun. En particulier, cette homologie est presque de 97% dans leur domaine de liaison à l'ADN (DBD) et de 60-65% dans le domaine de liaison au ligand (LBD) à l'extrémité carboxylique. L'homologie est en revanche beaucoup plus faible (20-30%) dans le domaine de transactivation AF1 à l'extrémité aminique (Maruyama, et al. 1998). Les gènes codants pour les trois membres se situent sur trois chromosomes différents. En particulier, les coordonnées chromosomiques pour NOR1 sont 9q22. Le gène NOR1 code pour une protéine de 68,5 KDa constituée de 628 acides aminés.

5.3 La distribution tissulaire

En accord avec le clonage originaire de ces récepteurs dans le système nerveux central, les trois membres de la famille NR4A sont fortement exprimés dans le cerveau (Law, et al. 1992; Milbrandt 1988). Leur expression est importante aussi dans les tissus à fort potentiel métabolique tels que le muscle squelettique, le tissu adipeux, le cœur, le pancréas et le foie (Ohkura, Hijikuro, et al. 1996; Yang, et al. 2006). De plus, la présence des trois membres NR4A a été démontrée dans les plaques athérosclérotiques et dans les cellules musculaires lisses humaines ainsi que dans les cellules endothéliales (Arkenbout, et al. 2002) et les mastocytes (Lundequist, et al. 2011). Bonta et collègues (Bonta, et al. 2006) ont démontré la présence de Nur77, Nurr1 et NOR1 dans les macrophages de la lésion d'athérosclérose humaine. La localisation des trois membres au sein de la plaque d'athérome varie en fonction de la complexité de la lésion. Les lésions peuvent être classifiées en quatre classes (classe I-IV) en accord avec les directives de la société américaine du Cœur (*American Heart Association, AHA*). Dans les lésions précoces de type II, l'expression protéique des NR4As se localise dans les noyaux des macrophages situés dans l'intima. Lorsque la lésion devient plus complexe (classe IV) l'expression est plus importante au niveau de l'épaulement de la lésion ainsi que dans les macrophages qui infiltrent plus profondément la media artérielle (Bonta, et al. 2006).

5.4 Le mécanisme d'action

5.4.1 Liaison à l'ADN

- Activité monomérique

Nurr1, Nur77 et NOR1 sont capables de se fixer en monomères sur la séquence consensus octamérique NBRE (*NGFIB Response Element*; 5'-AAAGGTCAC-3') identifiée par une sélection *in vivo* chez la levure, technique permettant de trouver les séquences cibles des protéines liant l'ADN (Nurr1 (Scarce, et al. 1993), Nur77 (Wilson, et al. 1991), NOR1 (Ohkura, et al. 1994)). Cette séquence est constituée par le demi-site AGGTCAC qui est également reconnu par les récepteurs aux estrogènes, aux hormones thyroïdiennes, à la vitamine D et les *Retinoid X Receptors* (RXR). Cependant, c'est la présence de deux adénines supplémentaires en 5' qui caractérise la séquence consensus NBRE reconnue par le DBD des NR4As (Wilson, et al. 1991).

- Activité dimérique

Au sein de la famille des NR4As, chacun des membres peut former des homodimères en reconnaissant une structure palindromique appelée NurRE (*Nur-responsive Element*) contenant deux sites distincts du NBRE séparés par 6 paires de bases (gTGATATTTacctccAAATGCCAg) (Philips, et al. 1997). A l'exception de NOR1 (Zetterstrom, et al. 1996), les NR4As sont capables de s'hétérodimeriser avec RXR (activé par l'acide 9-cis rétinolique) et de reconnaître des séquences consensus DR5 (répétition directe espacée de 5 nucléotides ; GGTTCAccgaaAGTTCA) (Maxwell and Muscat 2006). L'hétérodimerisation est aussi possible entre les trois membres de la famille. Ceci a été démontré pour la première fois par Maira et collègues. Ces auteurs ont d'ailleurs mis en évidence que lorsque ces facteurs hétérodimerisent, ils deviennent des activateurs de la transcription plus puissants que sous forme d'homodimères (Maira, et al. 1999).

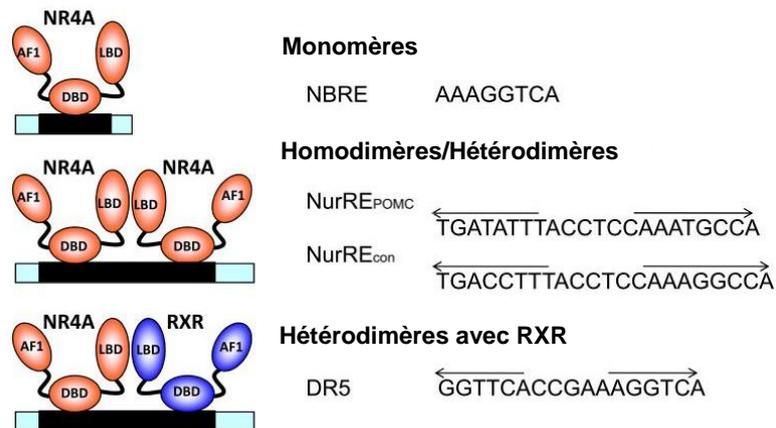


Figure 11. Modèle de liaison à l'ADN des récepteurs NR4As d'après Zhao Y, Drug Discov Today Dis Mech. 2009.

5.4.2 L'interaction avec les cofacteurs

- NOR1

Le domaine AF-1 joue un rôle clé dans le déroulement de l'activité transcriptionnelle de NOR1. Il est en fait capable d'interagir directement avec les co-activateurs, en particulier SRC-2 (*Steroid receptor coactivator-2*) qui d'ailleurs ne peut pas interagir directement avec le LBD du récepteur nucléaire car la poche normalement hydrophobe a été remplacée par une surface plutôt hydrophile (Wansa, et al. 2003). La séquence fonctionnelle a plus spécifiquement été circonscrite aux acides aminés 1-112. NOR1 interagit *in vitro* avec les cofacteurs SRC1, SRC2 et SRC3. La portion N-terminale possède une plus grande affinité que l'extrémité C-terminale pour ces coactivateurs et d'une façon préférentielle pour SRC2.

SRC2 accroît le potentiel de transactivation de NOR1 de façon dépendante de l'AF-1 (Wansa, et al. 2003). Les cofacteurs spécifiques aux récepteurs nucléaires p300, Drip 205, PCAF, et SRC2 interagissent directement avec NOR1 *in vitro*. Le complexe de coactivateurs se forme au niveau de la région N-terminale du récepteur. Par contre, la présence du LBD renforce ces interactions (Wansa, et al. 2002).

Plus récemment, il a été mis en évidence que la 6-mercaptopurine (6-MP), une molécule utilisée pour son action antinéoplasique et anti-inflammatoire (Cara, et al. 2004), module la capacité du domaine AF-1 des trois membres NR4As d'interagir avec les co-facteurs. Ceci ne concerne pas les principaux co-facteurs tels que SRC-2, mais plutôt TRAP220. TRAP220 interagit avec la région N-terminale (acides aminés 1-800) de NOR1 et augmente sa transactivation *via* AF-1. Cette modulation s'exerce indépendamment de la phosphorylation du domaine AF-1 de NOR1 par les protéines kinases PKC et PKA. En résumé, la 6-MP stimule le recrutement du coactivateur TRAP220 au niveau du récepteur NOR1 d'une façon dose-dépendante (Pei, Castrillo, et al. 2006; Wansa and Muscat 2005).

- Nur77

Tout comme NOR1, le domaine AF-1 à l'extrémité N-terminale de Nur77, situé entre les acides aminés 50 et 160, possède le potentiel d'activation de la transcription d'une façon indépendante de la fixation du ligand. AF-1 facilite le recrutement de co-activateurs et interagit directement avec SRC2, p300, PCA et DRIP-205. Plus précisément, l'association au cofacteur DRIP-205 est conditionnée à la présence de SRC2 et p300. Par ailleurs, SRC2 stimule intensivement l'activité transactivatrice du LBD de Nur77 en présence du DBD/LBD de RXR lié à son ligand (Wansa, et al. 2002).

ASC-2 (*Activating Signal Cointegrator-2*) constitue un exemple de co-activateur indirect de Nur77 car il agit comme un adaptateur en répondant à la phosphorylation par la Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CAMK). En contrepartie, SMRT se lie directement à Nur77 et inhibe son activité (McKenna, et al. 1999; Sohn, et al. 2001). Ce corépresseur possède plutôt une affinité pour le domaine AF-2 (Hu and Lazar 1999; Perissi, et al. 1999). Il a été démontré que la sous-unité p65 de NFκB interagit directement avec l'extrémité carboxylique de Nur77 et empêcherait le recrutement du co-activateur SRC-1 dont le rôle est celui de favoriser la trans-activation du RN (Hong, et al. 2004). Par ailleurs, un travail réalisé quasiment au même temps, a mis en évidence que cette répression est réciproque: en fait Nur77 serait aussi impliqué dans l'inhibition de la transactivation de NFκB (Harant and Lindley 2004).

- Nurr1

Dans le cas de Nurr1, le domaine principalement impliqué dans l'activation de la transcription est celui à l'extrémité carboxylique ou AF-2 (Castro, et al. 1999) qui est aussi nécessaire pour l'hétérodimérisation du RN avec RXR. Des études ont mis en évidence la présence d'une lysine au cœur du domaine AF-2 qui contraste avec la présence d'un acide glutamique dans la grande famille des RN (Castro, et al. 1999). Des expériences de mutations de ce résidu ont montré l'effet inhibiteur de cette lysine au sein du domaine AF-2. D'ailleurs, ce domaine, qui devrait constituer la surface d'interaction avec les cofacteurs, s'avère significativement différent de ceux observés parmi l'ensemble des récepteurs nucléaires. Cela souligne que les co-facteurs ne seraient pas recrutés *via* cette surface mais elle stabiliserait l'interaction de facteurs liant le domaine AF-1 (Wang, et al. 2003).

Saijo et collègues (Saijo, et al. 2009) ont démontré l'activité trans-répressive de Nurr1 sur l'expression des gènes pro-inflammatoires. En effet Nurr1 est recruté près de la sous-unité p65 de NFκB au niveau des promoteurs des gènes inflammatoires. Par la suite, Nurr1 recrute le complexe des co-répresseurs CoREST qui contient HDAC1 qui est responsable de la désacétylation, ce qui provoque le dégagement de p65.

5.5 Des récepteurs nucléaires orphelins

Comme déjà mentionné précédemment dans la section « Récepteurs Orphelins » et comme bien montré dans l'étude par cristallographie à rayons X (Figure 12), Nurr1 manque d'une poche pour accueillir le ligand. Cette caractéristique est commune aussi aux autres deux membres de la sous famille NR4A. Pour cette raison ils sont considérés comme étant des récepteurs nucléaires ayant une activité transcriptionnelle indépendante de la fixation d'un ligand. Malgré le fait que la poche propice à la liaison d'un ligand soit occupée par des résidus hydrophobes, l'hélice AF-2 de Nurr1 semble être stabilisée par des interactions intramoléculaires en absence de liaison à un ligand. Ainsi, la structure tertiaire du domaine de liaison au ligand de Nurr1 semblerait être similaire à celle des récepteurs dans leur état actif, liés à leur ligand. Ces résultats appuient l'hypothèse que ces récepteurs soient constitutivement actifs (Wang, et al. 2003).

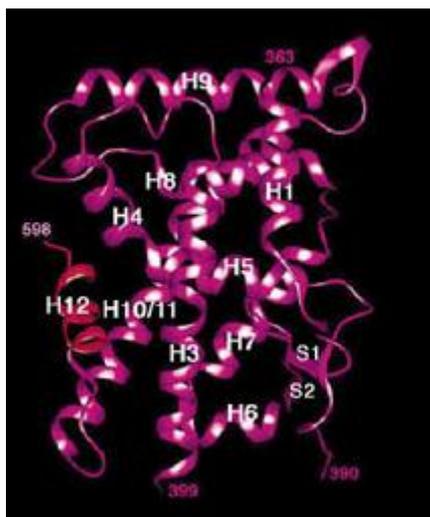


Figure 12. Représentation schématique du domaine de liaison à l'ADN (LBD) de Nurr1. Le LBD de Nurr1 est constitué de 12 hélices alpha (H1-H12) et deux feuillets beta (S1, S2) ; l'hélice AF2 de H12 est montrée en rouge. L'interaction entre H11 et H12 stabilise H12 en une conformation active pour la transcription (Wang Z, Nature 2003)

5.6 Des récepteurs nucléaires à réponse immédiate

Les RN de la famille NR4A sont des gènes capables de répondre à une grande variété de stimuli dans un temps très court, de l'ordre des minutes plus souvent que d'heures. Pour cette raison ils sont aussi appelés « *Immediate Early Genes* ». Leur expression peut être induite par les acides gras, le stress, les prostaglandines, les facteurs de croissance, le calcium, les cytokines inflammatoires, les hormones peptidiques, les esters de phorbol, les neurotransmetteurs et l'AMPC (Maxwell and Muscat 2006). Des stimuli physiologiques peuvent induire l'expression des membres de cette famille, tels que la dépolarisation membranaire, l'agitation mécanique qui cause les déplacements des fluides, les champs magnétiques et le rayonnement ultraviolet (Maruyama, et al. 1998; Maxwell and Muscat 2006).

5.7 Les isoformes

Des formes tronquées principalement dues à un épissage alternatif au niveau C-terminal ont été décrites pour NOR1 et Nurr1, alors qu'à ce jour, aucune n'a été reportée pour Nur77.

Le gène NOR1 chez l'Homme est constitué de 10 exons dont les deux premiers ainsi que la portion 3' du huitième sont non-codants (Ohkura, Ito, et al. 1996). Le transcrit correspondant au récepteur tronqué en C-terminal (NOR1ΔC) se compose des exons 1 à 5 plus 25 acides aminés qui correspondent à la séquence du début de l'intron 5 (Ohkura, et al. 1998). Initialement confondue par les auteurs qui suggéraient l'existence d'un second gène NOR2,

cette isoforme à été isolée à partir d'une librairie de cerveaux de rat (Petropoulos, et al. 1995) ainsi que mise en évidence comme gène de fusion avec EWS dans le contexte du développement d'une forme de chondrosarcomes (Labelle, et al. 1995). Labelle et collègues ont également décrit une isoforme du récepteur NOR1 tronquée en N-terminal (NOR1 Δ N) qui manque des 42 nucléotides au début de l'exon 3, menant à la perte du codon méthionine d'initiation de la traduction. Le recours au codon méthionine suivant comme site d'initiation, conduit à la production d'un récepteur manquant les 30 premiers acides aminés. Cette isoforme a été isolée à partir d'une banque d'ADNc de cœurs fœtaux humains (Labelle, et al. 1995).

Une seconde isoforme du récepteur Nurr1, nommée Nurr2, a été identifiée à partir d'une librairie d'ADNc de cellules MC3T3-E1 de souris (Ohkura, et al. 1999). Une délétion interne de 121 nucléotides entraîne l'apparition d'un codon stop qui produit la perte des 143 derniers acides aminés en C-terminal. Comme résultat, le RN est dépourvu du domaine de liaison au ligand. D'ailleurs, l'ARN messager de Nurr2 se distingue de Nurr1 aussi au niveau de l'extrémité 5'. Cette isoforme tronquée existe chez le rat et l'homme, étant exprimée dans les mêmes tissus que Nurr1, mais à un niveau plus faible.

5.8 Les facteurs modulant l'activité transcriptionnelle

5.8.1 Modifications post-traductionnelles

Tous les trois membres NR4A peuvent être phosphorylés au niveau des résidus de sérine en réponse à l'activation de plusieurs kinases par les facteurs de croissance et parfois suite à la dépolarisation des membranes. Parmi ces kinases, nous pouvons citer MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*), PKB/Akt (*protein kinase B*), JNK (*Jun-N-terminal kinase*) et RSK (*ribosomal S6 kinase*) (Laudet 1997; Wagner, et al. 2003). La phosphorylation peut intéresser des sérines dans le domaine du LBD, ce qui porte à une inhibition de la capacité de se lier à la double hélice et donc d'activer la transcription ou peut induire l'exportation des complexes d'homo/hétérodimères du noyau vers le cytoplasme. Les trois membres NR4A montrent également des séquences « consensus » pour la sumoylation. Nurr1 par exemple est sumoylé au niveau de la lysine 91 du domaine AF-1 et cela se traduit par une réduction de son activité transcriptionnelle (Arredondo, et al. 2013).

5.8.2 Localisation cellulaire

- NOR1

Un autre niveau de régulation est représenté par la localisation cellulaire du RN. Une étude réalisée dans les neurones de rat traités au glutamate pour en induire l'apoptose (Boldingh Debernard, et al. 2012), a montré que NOR1 se localise dans le noyau et que cette localisation n'est pas affectée par le traitement avec le glutamate, tandis que les deux autres membres se déplacent dans le cytoplasme. Une explication à ce comportement pourrait résider dans la capacité d'hétérodimérisation. En fait, la dimérisation de Nur77 avec RXR est responsable de sa sortie du noyau dans les cellules cancérogènes et dans les neurones (Cao, et al. 2004; Katagiri, et al. 2000; Lin, et al. 2004). Compte tenu du fait que RXR n'est pas un partenaire de transcription de NOR1, ceci pourrait expliquer pourquoi ce dernier ne passe pas dans le cytoplasme.

- Nur77

Globalement plus présent dans le noyau, Nur77 peut passer dans le cytoplasme suite à une phosphorylation (Fahrner, et al. 1990; Hazel, et al. 1991). De plus, la présence de deux NES (*nuclear export signal*) a été démontrée dans le domaine C-terminal de la protéine. Ces NES sont aussi essentiels pour localisation de Nur77 dans le cytoplasme. Suite à cette découverte, les mêmes auteurs ont mis en évidence que RXR suit Nur77 dans le cytoplasme et ceci s'accompagne d'une inhibition de l'activité transcriptionnelle de RXR-RAR (Katagiri, et al. 2000). La sortie de Nur77 du noyau vers le cytoplasme se fait par l'exportine CRM1 (Sun, et al. 2012) et conduit à sa localisation dans les mitochondries. Comme démontré par des expériences en utilisant des constructions tronquées, l'exportation du noyau est dépendante des domaines à l'extrémité carboxylique et aminique (Li, et al. 2000). Dans des modèles *in vitro* de surexpression, la présence de Nur77 a été observée dans les structures à sphères associées à la membrane et appelées corps nucléaires ou PML. Il s'agit d'une super structure du noyau présente dans la plus part de lignées cellulaires qui régule plusieurs fonctions incluant la réplication de l'ADN et la transcription (Wu, et al. 2002). Toutefois, cette observation n'a pas été reproduite dans des conditions basales avec le Nur77 endogène, ce qui met en doute l'importance de ce compartiment pour la fonction biologique de Nur77.

- Nurr1

C'est bien plus récemment que la localisation cellulaire a été suggérée comme étant un facteur modulant l'activité transcriptionnelle de Nurr1 (Garcia-Yague, et al. 2012). En effet, Nurr1 possède un NLS (*nuclear localisation signal*) et deux NES dans le domaine de liaison à l'ADN. Lorsque Nurr1 est privé de son NLS, il ne peut plus entrer dans le noyau. Au

contraire, quand les NES sont mutés, Nurr1 se localise principalement dans le noyau. En plus, NES2 s'avère être un senseur du stress oxydant, ce qui explique l'induction de l'exportation de Nurr1 du noyau suite à un traitement avec les arsénites, des inducteurs du stress oxydant (Garcia-Yague, et al. 2012).

5.8.3 Molécules agonistes ou co-activatrices

A ce jour, aucun ligand endogène n'est connu pour les membres de la famille NR4A. Plusieurs petites molécules agonistes ou coactivatrices ont été récemment identifiées telles que la 6-mercaptopurine (Wansa, et al. 2003), le 1,1-bis (3'-indolyl)-1-(p-methoxyphényl) méthane (Chintharlapalli, et al. 2005; Cho, et al. 2008) et les acides gras non-saturés ou UFAs (*unsaturated fatty acids*) (Vinayavekhin and Saghatelian 2011).

5.9 LES FONCTIONS BIOLOGIQUES

Pour la suite de cette section concernant les fonctions biologiques, je me focaliserai d'avantage sur NOR1, sans oublier de donner quelques détails relatifs aux autres deux membres de la famille NR4A.

5.9.1 **L'implication de NOR1 dans le métabolisme**

5.9.1a Métabolisme des glucides

L'expression des trois membres de la sous famille NR4A est augmentée dans le foie en réponse à plusieurs stimuli physiologiques, tels que le jeûne, ou en réponse à l'hormone glucagon (Oita, et al. 2009; Pei, Waki, et al. 2006). De façon plus générale, l'implication de ces récepteurs nucléaires dans le contrôle de l'homéostasie et le métabolisme du glucose est bien documentée. En particulier, NOR1 affecte la voie de signalisation de l'insuline en induisant la translocation à la membrane du transporteur de glucose GLUT4 d'une part, et la phosphorylation du substrat associé au récepteur pour l'insuline (IRS) dans les adipocytes, d'autre part. De plus, le niveau d'expression génique de NOR1 est diminué dans le tissu adipeux et dans le muscle squelettique de souris et rats obèses (Fu, et al. 2007). Dans le muscle, l'action de NOR1 sur la translocation de GLUT4 est renforcée par l'agoniste de NOR1, la 6-MP (Liu, et al. 2013). Récemment, il a été démontré que le facteur de transcription NK6 peut induire l'expression de NOR1 et Nur77 et cette régulation serait responsable de la prolifération des cellules beta-pancréatiques chez la souris (Tessem, et al. 2014).

5.9.1b Métabolisme des lipides

Plusieurs études parfois contradictoires soulignent le rôle des membres NR4A dans le métabolisme des lipides. Chao et collègues ont démontré que la sur-expression de NR4As dans les pré-adipocytes via un vecteur viral inhibe le processus de différenciation de pré-adipocytes en cellules adipocytaires matures (Chao, et al. 2008). En revanche, un deuxième travail a mis en évidence que ces récepteurs ne sont pas indispensables pour le processus d'adipogenèse (Au, et al. 2008). En fait, la suppression de leur activité par des formes mutantes n'a aucun effet sur l'expression des gènes impliqués dans la différenciation adipocytaire ni dans l'accumulation des lipides. Très peu de données concernant le profil lipidique des animaux knock out pour NOR1 (NOR1^{-/-}) sont disponibles à ce jour. L'injection de cellules provenant du foie de fœtus de souris NOR1^{-/-} dans un modèle de souris déficientes pour les deux allèles codifiant pour le récepteur aux LDL (LDLR^{-/-}), provoque une perte de poids en comparaison avec les souris *wild type*. D'ailleurs, ces souris ont aussi un taux de cholestérol plus bas par rapport aux souris contrôles, à l'état basal et suite à un régime athérogénique. La même tendance est observée pour les taux de triglycérides (Chao, et al. 2013). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle plutôt bénéfique pour NOR1 dans le contrôle de la prise de poids et de la dyslipidémie.

5.9.1c Métabolisme oxydatif

NOR1 a été indiqué comme nécessaire pour le métabolisme oxydatif. En fait, la diminution de son expression par une approche de transfection avec un siRNA spécifique contre NOR1 dans des cellules musculaires squelettiques, augmente la production de lactate et diminue l'oxydation des acides gras. Ceci est accompagné par une réduction de l'expression des enzymes du métabolisme aérobie (Pearen, et al. 2006). Ces données *in vitro* ont été confirmées par des expériences *in vivo* d'activation spécifique de l'expression de NOR1 dans les muscles squelettiques chez la souris. Cette approche entraîne une augmentation du nombre des mitochondries qui s'accompagne d'une expression accrue des enzymes oxydatifs et des gènes codifiant pour les complexes de la chaîne de transport des électrons au niveau de la membrane mitochondriale (Pearen, et al. 2012).

5.9.1d Homéostasie énergétique

L'expression génique de tous les membres de la sous-famille NR4A est augmentée suite à une exposition au froid. Par ailleurs, NOR1 est le plus fortement régulé et il induit l'expression de l'UCP1 (*Uncoupling Protein 1*) (Kumar, et al. 2008). Cette protéine est spécifique de la

membrane mitochondriale des adipocytes du tissu adipeux brun et joue un rôle clé dans la balance énergétique et dans le maintien de la thermogenèse (Ricquier and Bouillaud 2000). De plus, la diminution de l'expression de NOR1 dans l'hypothalamus de souris, réduit l'appétit et réprime leur prise de poids (Nonogaki, et al. 2009). Toutes ces données soulignent l'implication des récepteurs NR4A dans la balance énergétique, sans toutefois en clarifier pour l'instant les mécanismes moléculaires.

5.9.2 La régulation et les rôles fonctionnels de NOR1 dans les cellules vasculaires

5.9.2a NOR1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Dans les cellules musculaires lisses (CML) des vaisseaux, NOR1 répond d'une façon forte et immédiate à des stimuli très hétérogènes tels que le sérum, les LDL natives et des facteurs de croissance comme le facteur de croissance des plaquettes (PDGF-BB), le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et l'alpha-thrombine (Arkenbout, et al. 2002; de Vries, et al. 2000; Martinez-Gonzalez, et al. 2003; Rius, et al. 2004). Deux régulateurs clé de la migration et de la prolifération des CML vasculaires, la PKC et la concentration de calcium intracellulaire, sont aussi capables d'induire l'expression de NOR1 (de Vries, et al. 2000). Il a été démontré que NOR1 augmente la capacité des CML vasculaires à migrer et à proliférer dans un model de «*wound repair*» (réparation de la blessure) *in vitro* (de Vries, et al. 2000). Plus récemment, ces données ont été validées aussi *in vivo* accompagnées par l'observation que la cycline D1, impliquée dans la progression du cycle cellulaire, serait un nouveau gène cible de NOR1 (Nomiyama, et al. 2009). Toujours en accord avec ces résultats, NOR1 a été associé à une activité mitogénique dans un modèle *in vivo* de surexpression de ce récepteur dans les CML après lésion vasculaire (Rodriguez-Calvo, et al. 2013).

Toutes ces données supportent l'idée que NOR1 puisse jouer un rôle dans les mécanismes moléculaires à la base de la prolifération des CML vasculaires et de l'accélération du développement de l'athérosclérose.

5.9.2b NOR1 dans les cellules endothéliales (CE)

L'expression de NOR1, tout comme celle de Nurr1 et de Nur77, est fortement induite par le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) dans les CE (Liu, et al. 2003). D'ailleurs, VEGF n'augmente pas seulement l'ARNm de ces récepteurs mais favorise aussi la déphosphorylation de Nur77 en augmentant son activité transcriptionnelle (Liu, et al. 2003; Pekarsky, et al. 2001). Compte tenu du fait que les trois membres NR4A ont une forte homologie, il est probable que l'expression de NOR1 soit aussi régulée par ce mécanisme.

L'hypoxie fait aussi partie des facteurs capable d'induire l'expression de NOR1 par un mécanisme indépendant de VEGF et qui voit plutôt l'interaction de HIF-1alpha avec le promoteur de NOR1. Ainsi NOR1 est impliqué dans les mécanismes de défense en réduisant l'apoptose des CE induite par le manque d'oxygène (Zhao and Bruemmer 2010). De façon intéressante, il a été démontré que NOR1 induit l'expression de VCAM-1 et ICAM-1 dans des CE en culture. VCAM-1 a été décrit comme potentiel nouveau gène cible de NOR1 (Zhao, et al. 2010). De plus, des essais d'adhérence de monocytes ont mis en évidence comment la sur-expression de NOR1 dans la lignée cellulaire HUVEC (CE de la veine du cordon ombilical humain) et dans les CE isolées de l'aorte porte à une adhérence accrue de monocytes (Zhao, et al. 2010).

5.9.2c NOR1 dans les macrophages

Les macrophages activés par différents stimuli pro-inflammatoires montrent une expression accrue de NOR1 (Pei, et al. 2005). D'ailleurs, l'expression de NOR1 co-localise avec les macrophages dans les lésions humaines d'athérosclérose (Bonta, et al. 2006). Toutefois, les données concernant les fonctions de NOR1 dans les macrophages sont encore limitées. L'expression de NOR1 est fortement induite dans la lignée cellulaire de monocytes humains THP1 suite à un traitement avec le PMA (phorbol myristate acétate), qui en permet la différenciation en macrophages, ou par le LPS et d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α , IFN γ et IL-1 β (Bonta, et al. 2006). Dans le même type cellulaire, l'expression de NOR1 est aussi sensible aux facteurs de croissance M-CSF et GM-CSF. Le LPS stimule l'expression des trois membres NR4A aussi dans les macrophages primaires humains qui dérivent des monocytes circulants. L'induction de ces récepteurs par le LPS a été davantage étudiée dans les THP1 au cours d'une expérience de type cinétique. Les trois membres sont induits déjà après une heure de stimulation ; de façon intéressante, le niveau de l'ARNm de Nur77 et Nurr1 commence à diminuer très tôt, tandis que celui de NOR1 reste élevé pendant 24 heures (Pei, et al. 2005). Quand les cellules THP1 sont traitées avec des LDL pendant 48 heures, une forte induction de NOR1 est observée en réponse aux LDL oxydées mais pas en réponse aux LDL natives ou acétylées (Pei, et al. 2005). NOR1 montre des propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires. En effet, il est capable d'induire l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation inflammatoire dans la lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7, tels que MARCKS (*myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate*), CXCL10 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 10*) et IKKi (*inhibitor of kappaB kinase epsilon*), ce dernier contenant des éléments de réponse NBRE dans le promoteur (Pei, Castrillo, et al.

2006). En parallèle, NOR1 est responsable de l'inhibition de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL1 β , IL6, IL8 et MCP1 dans les macrophages humains. Des expériences de sur-expression et de diminution de l'expression de NOR1 ont permis de mettre en évidence que NOR1 est capable d'inhiber la captation du cholestérol suite à une baisse de l'expression de SR-A, CD36 et CD11b, connu pour être un marqueur macrophagique. Ces données mettent aussi en évidence la propriété de NOR1 de réduire l'activation des macrophages dans le contexte d'une réponse inflammatoire ainsi que leur transformation en cellules spumeuses (Bonta, et al. 2006).

5.9.3 NOR1 et l'athérosclérose

Les souris déficientes pour les deux allèles codants pour l'apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}), un modèle transgénique qui présente une sévère hypercholestérolémie associé à des lésions athéroscléreuses (Kapourchali, et al. 2014) et aussi déficientes pour NOR1, présentent une réduction de l'athérosclérose induite par l'hypercholestérolémie due à une baisse du nombre de macrophages présents dans la lésion (Zhao, et al. 2010). Une étude plus récente suggère l'implication de NOR1 de cellules souches hématopoïétiques (CSH) comme ayant un rôle dans le développement de l'athérosclérose. Les souris apoE^{-/-} qui reçoivent des CSH déficientes en NOR1 et qui sont soumises à un régime riche en gras, développent plus rapidement l'athérosclérose avec une infiltration majeure de macrophages au sein de la lésion. L'absence de NOR1 dans les CSH a un effet pro-athérogène dû à l'augmentation de divisions cellulaires au sein des lésions. En parallèle, il a été mis en évidence que NOR1 dans les cellules progénitrices des monocytes réprime l'expression de RUNX1, facteur impliqué dans la prolifération des cellules myéloïdes (Qing, et al. 2014). Ceci représente un possible mécanisme expliquant la prolifération des progéniteurs monocytaires dans les souris NOR1^{-/-}. Pour renforcer le caractère anti-athérogène de NOR1 dans les CSH, les auteurs décrivent une augmentation de la formation des cellules spumeuses, qui n'est cependant associée à aucun effet sur l'expression des gènes pro-inflammatoires (Qing, et al. 2014). Ces résultats montrant NOR1 comme promoteur du développement de l'athérosclérose, sont contredits par le travail réalisé par Chao et collègues qui affirment que NOR1 ne joue pas un rôle clef dans le développement de cette pathologie. Les auteurs mettent en évidence que les souris LDLR^{-/-} qui reçoivent des hépatocytes fœtaux ou des macrophages issus de la moelle osseuse de souris knock-out pour NOR1 n'ont aucune modification de la lésion d'athérome (Chao, et al. 2013). D'ailleurs, ces souris ne montrent aucune variation des taux plasmatiques de cholestérol ni de

triglycérides et lorsque les macrophages sont stimulés avec du LPS, l'expression des gènes pro-inflammatoires n'est pas affectée.

5.10 NR4A ET LA POLARISATION DES MACROPHAGES

Le rôle de NR4A et plus particulièrement celui de NR4A1 (Nur77) a été étudié davantage dans les monocytes. Plusieurs études ont montré que les monocytes murins Ly6C⁺ ont tendance à se différencier en macrophages M1 avec un phénotype pro-inflammatoire (Auffray, et al. 2007; Nahrendorf, et al. 2007). D'autre part, les monocytes Ly6C⁻ tendent plutôt à se différencier en macrophages M2 avec un phénotype anti-inflammatoire (Tacke, et al. 2007).

Hanna *et al* (Hanna, et al. 2011) ont montré que NR4A1 est fortement exprimé dans les monocytes Ly6C⁻, ce qui suggère son rôle dans ce sous-type de monocytes. En fait, dans les souris déficientes pour les deux allèles codant pour NR4A1, on enregistre une perte quasiment complète des monocytes Ly6C⁻ alors que le nombre de monocytes Ly6C⁺ varie sensiblement. Cette diminution semble être due à l'incapacité des progéniteurs à se différencier pour donner le sous-type monocyttaire Ly6C⁻. Le peu de monocytes Ly6C⁻ restant dans la moelle osseuse des souris NR4A1^{-/-} arrêtent leur cycle cellulaire en phase S (synthèse de l'ADN) et s'acheminent ensuite vers le processus de l'apoptose. Tout cela est associé à une diminution de l'expression des facteurs connus pour être importants dans la différenciation des monocytes et macrophages. En résumé, ces données suggèrent que Nur77 fonctionne comme un régulateur important de la différenciation et de la survie des monocytes Ly6C.

Par la suite, ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris ApoE^{-/-} pro-athérogènes (Hanna, et al. 2012). Dans ce modèle il a été mis en évidence le rôle de la délétion de NR4A1 responsable de la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire. En effet, de même que les monocytes Ly6C⁺ produisent plus de cytokines pro-inflammatoires, les macrophages issus de ces souris produisent plus d'IL-12, TNF α , iNOS avec comme conséquence une activation accrue de NF κ B. Le profil d'expression de Nur77 observé chez la souris est confirmé chez l'homme : NR4A1 est fortement exprimé dans les monocytes CD14⁻ CD16⁺ qui correspondent aux monocytes murins de surveillance Ly6C⁻. L'activation excessive de NF κ B dans les monocytes NR4A1^{-/-} est probablement due à la réduction de l'expression d'I κ B α . Il est possible qu'en absence de NR4A1, l'inhibition de la voie de signalisation de NF κ B soit réduite. De ce fait, les cellules myéloïdes subissent une transition vers le phénotype inflammatoire (Hanna, et al. 2012). Un rôle similaire a été suggéré pour

Nurr1 dans l'inhibition de l'expression des médiateurs neurotoxiques pro-inflammatoires de la voie de signalisation NFκB dans les cellules microgliales et les astrocytes (Saijo, et al. 2009). Dans son étude, Carlin, décrit les monocytes de surveillance Ly6C⁻ NR4A1-dépendants comme capables de s'accumuler dans les capillaires vasculaires et d'éliminer les microparticules et les débris cellulaires nécrotiques du fluide sanguin (Carlin, et al. 2013). Toutefois, certaines notions sont encore floues. Par exemple, la contribution réelle des monocytes de surveillance dans la résolution de l'inflammation ainsi que les caractéristiques de la population des macrophages qui dérive des ces monocytes Ly6C⁻ ne sont pas encore élucidées.

En parallèle, Hamers et son groupe, en utilisant le modèle murin NR4A1^{-/-} LDLR^{-/-} a également montré une augmentation de l'expression de certains facteurs pro-inflammatoires tels que IL-12, iNOS, SDF-1 (CXCL12) et IFNγ associée à une induction moins importante d'IL-10 en réponse au LPS (Hamers, et al. 2012). Ces résultats sont complétés par une étude de l'expression des marqueurs de la polarisation alternative qui met en évidence qu'en absence de Nur77, l'expression de FIZZ1 diminue tandis que l'expression d'Arg1 n'est pas affectée. Globalement, ces données soulignent le rôle anti-inflammatoire potentiel de NR4A1. Cependant, ces résultats ont été démentis par Chao *et al* (Chao, et al. 2013) qui affirment que dans un modèle de souris LDLR^{-/-} greffé avec des hépatocytes fœtaux NR4A1-déficient on note une augmentation de l'expression du marqueur alternatif FIZZ1. Cela est accompagné par une baisse du nombre de monocytes Ly6C⁻. Aucune modification dans la production de cytokines pro-inflammatoires suite au traitement avec le thioglycollate n'est retrouvée dans les macrophages. Ceci témoigne que la modulation des taux de monocytes « de surveillance » par NR4A1 n'est pas suffisante pour influencer le phénotype des macrophages.

Dans cette même étude, Chao *et al* se sont intéressés également au troisième membre de la famille NR4A, NOR1, qui contrairement à NR4A1, n'a aucun effet sur le nombre des monocytes ni sur la polarisation des macrophages. Ce n'est que récemment que ce rôle a été également attribué à NOR1. Qing *et al* ont enregistré un phénomène de monocytose en montrant que chez les souris ApoE^{-/-}, la délétion spécifique de NR4A3 dans les cellules hématopoïétiques a pour conséquence une augmentation du nombre des progéniteurs et des monocytes pro-inflammatoires Ly6C⁺ (Qing, et al. 2014).

Enfin, une toute récente étude réalisée dans un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris NR4A1^{-/-} a démontré que ce récepteur nucléaire contrôle le phénotype des monocytes dans la phase aiguë et dans la phase plus tardive réparatrice de l'infarctus (Hilgendorf, et al. 2014). Par ailleurs, la réponse macrophagique au cours de l'infarctus du myocarde est bi-phasique.

Cela peut s'expliquer selon deux hypothèses : la différenciation de plusieurs phénotypes à partir du même sous-type de monocytes et/ou le recrutement séquentiel des monocytes. Les auteurs montrent que le nombre de monocytes Ly6C⁺ est très élevé au cours de la première phase de ce phénomène et que ces monocytes peuvent ensuite se différencier en monocytes Ly6C⁻ ou de surveillance. De plus, les monocytes NR4A1^{-/-}Ly6C⁺ présentent une expression élevée et anormale du récepteur à la chimiokine CCR2 qui serait responsable de la mobilisation et du recrutement de ces monocytes. Ainsi dans le sang de ces souris, on détecte une quantité importante de MCP-1, ligand pour CCR2. Ces données soulignent le rôle de NR4A1 dans la répression du recrutement des monocytes pendant la phase inflammatoire aigüe de l'infarctus.

6. LA FAMILLE GROUCHO/TLE/GRG

6.1 La découverte

Parmi les co-répresseurs, nous pouvons citer la grande famille Groucho/TLE qui fait partie de la voie de signalisation Notch. Le premier membre, Gro, a été découvert en 1968 chez la *Drosophile*. Il est connu aussi sous le nom de « Groucho » car son identification est associée à une modification génétique qui entraîne l'apparition d'une touffe de poils au dessus des yeux de la *Drosophile*, qui rappelle les sourcils fournis du comédien américain Groucho Marx. Gro se localise dans la région chromosomique du complexe *Enhancer of Split* (E(spl)-C) qui contient son homologue humain TLE (*Transducin-Like Enhancer of Split*) identifié en 1992 (Stifani, et al. 1992). Au cours de cette même année, quatre gènes, nommés TLE1 à TLE4, ont été caractérisés dans cette famille chez l'homme. Les homologues découverts chez la souris ont été appelés Grg (*Groucho-related-gene proteins*) (Mallo, et al. 1993).

6.2 La structure

Si chez la *Drosophile* il existe une seule protéine Groucho, plusieurs sont exprimées chez les mammifères. Selon la taille de leur structure, ces dernières peuvent être distinguées en deux groupes.

Le premier groupe est celui des protéines TLE de grande taille (~95KDa) constituées de 5 domaines (Figure 13):

1. Le **domaine Q** se situe à l'extrémité aminique (Nter), très fortement conservé. Il est responsable de l'oligomérisation de la protéine et de son activité répressive. Pour ces fonctions, deux motifs *leucine-zipper-like* sont requis en accord avec l'hypothèse qu'ils puissent s'organiser en une structure appelée « *coiled-coils* » constituée par deux hélices alpha amphipathiques. Le domaine Q permet aussi l'interaction avec plusieurs autres facteurs de transcription tels que les protéines TCF/LEF (*T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*) (Courey and Jia 2001; Parkhurst 1998).
2. Le **domaine GP**, riche en glycines et prolines, est faiblement conservé chez les vertébrés et les invertébrés. Il est essentiel pour l'interaction avec les autres protéines telles que l'histone désacétylase HDAC et la protéine groupe 1 à haute mobilité (*High mobility group protein 1*, HMGB1). Ces dernières constituent des exemples de protéines importantes pour l'organisation de l'ADN et la régulation de la transcription (Dintilhac and Bernues 2002).

3. Le **domaine CcN** contient deux sites de phosphorylation, CK2 (Caséine kinase 2) et *cdc2* (*cell cycle dependent kinase 2*), à côté du signal de localisation nucléaire NLS. Lorsque le site *cdc2* subit une inhibition pharmacologique, l'activité transcriptionnelle répressive de TLE1 est augmentée (Nuthall, Joachim, et al. 2002). D'autre part, TLE1 est phosphorylé à l'état basal au niveau du site CK2 et ceci devient important pour son interaction avec les partenaires de liaison à l'ADN, connus sous le nom de *cofactor-activated phosphorylation* (Nuthall, Joachim, et al. 2002).
4. Le **domaine SP**, riche en sérines et prolines, est également faiblement conservé et phosphorylé par HIPK2 (*Homeodomain-interacting protein kinase 2*) et MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*), modification qui réduit son activité de répresseur de la transcription (Choi, et al. 2005; Hasson, et al. 2005).
5. Le **domaine WDR** comprenant ~300 résidus aminés, situé à l'extrémité carboxylique et caractérisé par des répétitions de tryptophane et aspartate, est le plus fortement conservé parmi les différentes portions de la protéine Gro/TLE. Il possède une structure très particulière, formée par sept lames, chacune constituée par 4 feuilletts bêta anti-parallèles (Pickles, et al. 2002). Grâce à cette structure, la protéine Gro/TLE peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription, qui contiennent le motif Eh1 (*Engrailed Homology 1*) ou WRPW/Y.

Le deuxième groupe se compose de formes tronquées de la protéine TLE décrite précédemment. Parmi ces protéines, AES/Grg5 (~25 KDa), composée de 130 résidus aminés, est constituée par la seule extrémité aminique de *Enhancer of Split*. Cette extrémité contient le domaine Q qui montre 70-75% de similarité avec celui des protéines Gro/TLE de grande taille et le domaine GP de 60 résidus aminés qui en revanche présente très peu de similarité avec celui des autres Gro/TLE (Buscarlet and Stifani 2007). A ce jour, le rôle physiologique de cette protéine tronquée n'est pas clairement identifié. Cependant, il a été démontré que AES/Grg5 peut former des hétérodimères avec les protéines TLE/Grg en réprimant leur action (Jan, et al. 2004; Zhang, et al. 2008).

Une autre protéine appartient au groupe des formes tronquées, la protéine TLE6/Grg6 (~70 KDa). Cette dernière est constituée par la seule extrémité carboxylique contenant le domaine WDR. Sa structure montre une similarité très faible avec les autres Gro/TLE, à l'exception du motif *coiled-coil* à l'extrémité N-terminale et d'une courte région interne qui rappelle le domaine CcN de Gro/TLE (Marcal, et al. 2005). Cette protéine est capable d'interagir avec des facteurs qui reconnaissent le domaine WDR et en général elle bloque l'action de Gro/TLE.

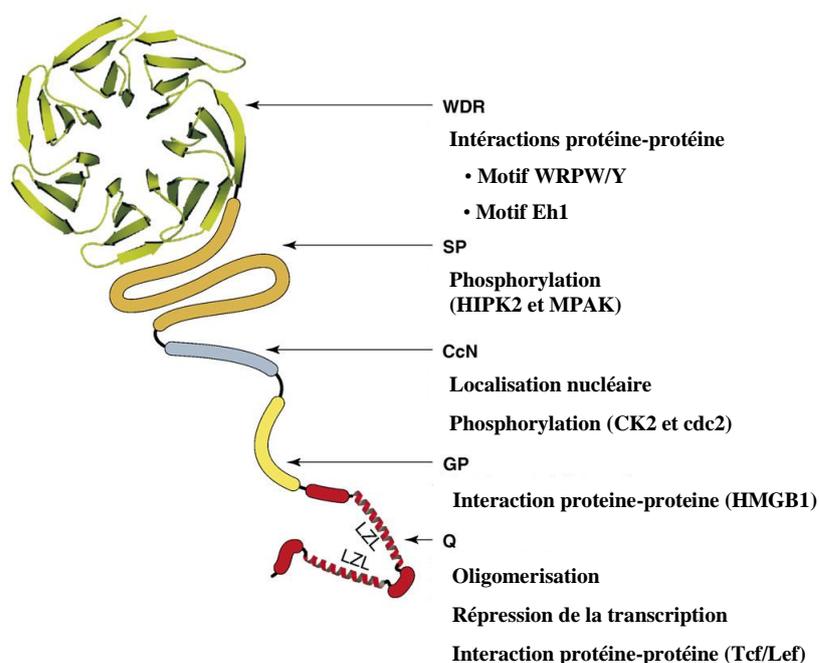


Figure 13. La structure des protéines Gro/TLE de grande taille d'après Buscarlet M, *TRENDS in Cell Biology* 2007

6.3 La distribution tissulaire

Environ 19 protéines homologues de Gro existent parmi les vertébrés et les invertébrés ; aucune n'a été découverte dans les domaines des plantes, champignons et protistes. En accord avec leur rôle de co-répresseurs, elles se localisent principalement dans le noyau. Cependant, l'expression de TLE1/Grg1 se retrouve aussi en dehors du noyau, dans les dendrites d'un type particulier de neurones (cellules de Purkinje) situées dans le *cerebellum* (Stewart and Stifani 2005). Des analyses de Northern Blot réalisées sur des tissus humains, ont mis en évidence l'expression de TLE1-4 dans le cœur, le cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle, le rein et le pancréas avec différents taux d'expression en fonction du tissu.

6.4 Mécanisme d'action

Les membres de la famille Gro/TLE agissent comme des co-répresseurs. En effet, il est bien établi que ces protéines ne se fixent pas directement à l'ADN mais sont recrutées sur les régions de régulation des gènes suite à l'interaction avec des facteurs de transcription liant l'ADN. Des études ont révélé l'existence de larges complexes de nucléoprotéines

capables de médier la répression et appelés « répressosomes ». La famille Groucho semble bien appartenir à cette catégorie. Cependant, d'après la littérature, très peu de données sont disponibles concernant le mécanisme de répression mis en place par Gro/TLE et plusieurs modèles ont été proposés. Ces modèles sont décrits ci-dessous.

6.4.1 Interaction directe avec la chromatine

Tup1, qui est connu pour être l'homologue de Groucho chez la levure, peut interagir directement avec la chromatine *via* l'interaction avec les extrémités aminiques des histones H3 et H4, qui doivent être de préférence dans leur état hypo-acétylé (Edmondson, et al. 1996; Edmondson, et al. 1998). Gro/TLE1 peut aussi interagir avec toutes les 4 histones avec une préférence pour l'histone 3 ; en revanche, aucune donnée n'est disponible concernant l'influence du niveau d'acétylation sur l'affinité de l'interaction (Flores-Saaib and Courey 2000; Palaparti, et al. 1997). D'ailleurs, il a été démontré que Grg3, l'homologue chez la souris de TLE1, peut se lier à la chromatine condensée (Sekiya and Zaret 2007) (Figure 14A).

6.4.2 Interaction avec la machinerie transcriptionnelle

L'action répressive de la famille Gro, et en particulier de Tup1, peut être aussi exercée sans contact direct avec la chromatine mais plutôt suite à l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle (Figure 14B), notamment la ARN-polymérase II (Herschbach, et al. 1994; Redd, et al. 1997). De ce fait, des expériences de mutation de sous-unités de cette enzyme empêcheraient l'activité répressive de Tup1 (Kuchin and Carlson 1998; Wahi and Johnson 1995). Des travaux publiés récemment ont démontré la capacité de Tup1 à interagir avec d'autres acteurs et former un complexe appelé « médiateur » qui prend contact avec l'extrémité carboxylique de l'ARN-polymérase II (Malik and Roeder 2010). En revanche, aucune donnée publiée n'est disponible pour Gro/TLE quant à la possibilité qu'eux aussi puissent interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle.

6.4.3 Interaction avec les désacétylases des histones (HDAC)

Les protéines Gro peuvent aussi interagir avec les désacétylases des histones (Figure 14A), telles que Rpd3. Cette interaction a lieu grâce au domaine GP (Chen, et al. 1999). Lorsque l'activité de désacétylation de Rdp3 est invalidée par des mutations, Gro perd sa capacité répressive à souligner l'importance d'un faible niveau d'acétylation des histones pour assurer la fonctionnalité de ce répresseur. Ces données ont été renforcées plusieurs années

plus tard par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, qui ont mis en évidence la co-localisation de Gro et HDAC au niveau des résidus spécifiques de lysine sur les histones H3 et H4 (Winkler, et al. 2010).

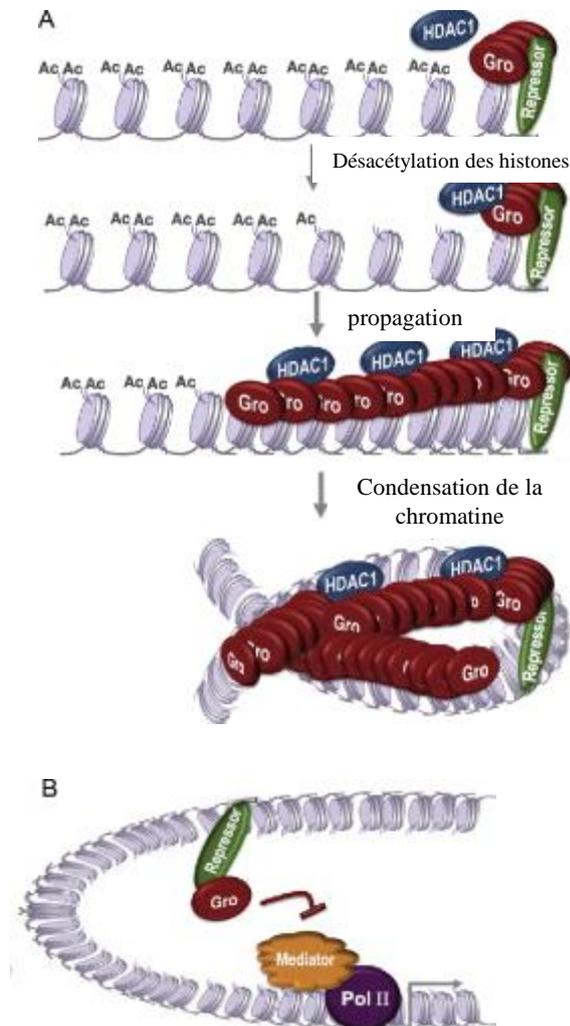


Figure 14. Les modèles de répression mis en place par Gro/TLE. A, les protéines Gro/TLE peuvent s'associer entre elles, recruter les désacétylases des histones, se lier aux histones acétylés et enfin faciliter la condensation de la chromatine. B, Gro/TLE peuvent interagir avec *Mediator*, un composant de la machinerie transcriptionnelle (Turki-Judeh W, Current Topics in Developmental Biology 2012)

6.4.4 Interaction avec les protéines et oligomérisation

Les protéines qui interagissent avec Gro peuvent être classifiées en deux catégories : les facteurs de transcription qui possèdent une séquence spécifique de liaison à l'ADN, qui est aussi responsable de leur recrutement auprès de Gro/TLE et la deuxième catégorie constituée par les protéines qui suite à leur oligomérisation avec le répresseur, contribuent

à son action répressive. Par la suite je vais donner quelque détail supplémentaire concernant les mécanismes de ces deux types d'interaction.

- Lorsque les facteurs de transcription sont recrutés sur le filament d'ADN via une séquence spécifique, un système d'interactions favorables se déclenche entre Gro et les histones. Ce phénomène de « nucléation » se traduit par la formation d'un polymère de protéines Gro qui se répand tout au long du filament d'ADN. Ce polymère constitue une interface pour le recrutement des autres facteurs tels que les désacétylases des histones. Tout cela contribue à l'instauration d'une structure transcriptionnelle « muette » de la chromatine (hétérochromatine) (Figure 15).

- L'oligomérisation des membres de la famille Gro semble être aussi nécessaire pour leur activité répressive (Song, et al. 2004). C'est le cas de Tup1 qui forme un complexe tétramérique avec la protéine Ssn6, constituée de 4 sous-unités de Tup1 et une sous-unité de Ssn6 (Redd, et al. 1997; Varanasi, et al. 1996). Gro également peut former des tétramères, toutefois la présence de Ssn6 n'est pas requise ; de plus, l'oligomérisation est médiée par le domaine Q, qui n'est pas conservé dans Tup1 (Chen, et al. 1998). D'ailleurs, des homologues de Ssn6 chez les mammifères capables d'interagir avec Gro ont été découverts (Grbavec, et al. 1999). Cependant, il faut noter que l'oligomérisation de Gro/TLE n'est pas toujours nécessaire pour son activité de répresseur au niveau des gènes cibles de Gro (Jennings, et al. 2008).

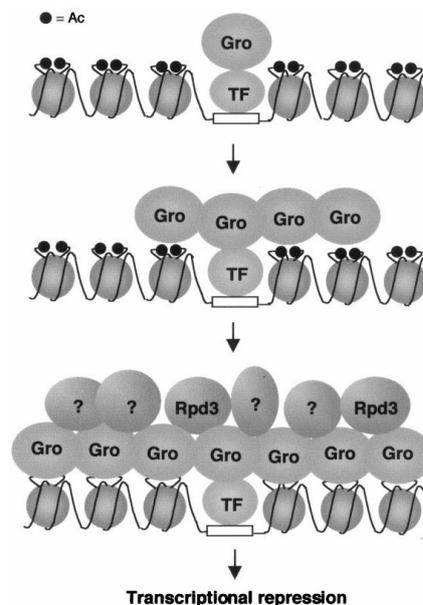


Figure 15. Le mécanisme d'action de TLE : l'oligomérisation avec la première catégorie de protéines. Ac (résidus de Lysine acétylés à l'extrémité Nter des histones), TF (facteur de transcription liant l'ADN) d'après Chen G, Gene 2000.

6.5 Gro/TLE comme co-activateurs

Les protéines TLE sont principalement connues comme répresseurs de la transcription. Toutefois, des travaux récents ont démontré leur rôle comme activateurs. Un exemple est donné par TLE3 dont l'expression génique et protéique augmente au cours de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures et répond à l'activation de PPAR γ . TLE3 est en fait recruté avec PPAR γ sur l'élément de réponse de PPAR γ (PPRE) dans les gènes cibles de ce dernier. Selon l'hypothèse plus accréditée, TLE3 induirait le remodelage de la chromatine en favorisant une structure qui faciliterait la liaison de PPAR γ sur le filament d'ADN (Villanueva, et al. 2011). Dans les cellules du cancer du sein, TLE1 a aussi été montré pour agir comme activateur car il est nécessaire pour la liaison du récepteur aux œstrogènes et son activité transcriptionnelle (Holmes, et al. 2012).

6.6 Gro comme convertisseur des activateurs en répresseurs

Plusieurs facteurs capables d'interagir avec Gro sont considérés à la fois comme des activateurs et des répresseurs de la transcription ; cela dépend de leur capacité à recruter Gro au niveau du promoteur de gènes. Encore une fois, cette capacité est fonction du contexte des sites de liaison du facteur de transcription (FT) et de la disponibilité des co-activateurs de déplacer Gro pour interagir avec le FT. En général, Gro en se liant à un activateur peut empêcher l'interaction avec des co-activateurs ou induire un changement de la conformation qui rend cet activateur inactif (Chen and Courey 2000).

La famille Runt constitue un premier exemple de protéines interagissant avec Gro qui sont connues pour réprimer et activer la transcription (Chen and Courey 2000). Dorsal est un FT avec un rôle important dans la formation de l'axe ventral -dorsal chez les embryons de la Drosophile (Anderson 1998; Belvin and Anderson 1996; Courey and Huang 1995) et qui se comporte comme un activateur et au même temps comme un répresseur de la transcription. Dubnicoff et collègues ont pu montrer que Dorsal interagit physiquement avec Gro grâce à une approche de protéines de fusion GST et co-immunoprécipitation dans la lignée cellulaire sf9 de *Spodoptera frugiperda*. Ce résultat est en faveur d'une inhibition de la transcription via le recrutement direct de Gro sur le filament d'ADN (Dubnicoff, et al. 1997). En revanche, Dorsal agit comme activateur de la transcription lorsqu'il interagit avec d'autres co-activateurs tels que CPB (*CREB-binding protein*) et TAF (*TBP-associated factors*) (Akimaru, et al. 1997; Zhou, et al. 1998). Une autre protéine dont l'activité répressive est fortement dépendante de l'interaction avec Gro, est Tcf de Drosophile (dTcf), ou Pangolin, une protéine faisant partie de la famille HMGB.

Elle interagit directement avec Gro comme il a été démontré dans la lignée cellulaire COS ; ainsi, cette interaction est nécessaire et indispensable pour la répression de la transcription de la part de dTcf (Cavallo, et al. 1998; Levanon, et al. 1998). En fait, une baisse du niveau de Gro cause la perte de l'activité répressive de dTcf, ce qui démontre que Gro est un co-répresseur de dTcf. Enfin, Pax2, est un FT caractérisé par la présence d'un domaine paire de liaison à l'ADN, et qui agit comme trans-activateur suite à sa phosphorylation. Lorsque Gro/TLE se lie à Pax2, la phosphorylation est inhibée et Pax2 passe de la fonction d'activateur à celle de répresseur de la transcription (Cai, et al. 2003).

6.7 Facteurs modulant l'activité transcriptionnelle

6.7.1 Modifications post-traductionnelles

La phosphorylation est impliquée dans l'action répressive de Gro en la modulant d'une façon soit positive soit négative. Les protéines Grg/TLE contiennent des sites de phosphorylation pour plusieurs kinases au niveau du domaine CcN (Stifani, et al. 1992). CK2 par exemple phosphoryle TLE1 au niveau de la sérine 239 et cela augmente l'association avec la chromatine et les facteurs de transcription avec comme conséquence une augmentation de l'activité répressive de TLE1 (Nuthall, et al. 2004). Pendant la mitose, le domaine CcN est aussi phosphorylé par la kinase Cdc2 (Nuthall, Joachim, et al. 2002). Cette modification semble réduire l'interaction avec la chromatine pendant la division cellulaire. D'une façon similaire, la phosphorylation de sérines dans le domaine SP de la part de HIPK2 diminue la liaison de Gro avec le facteur transcriptionnel Pax6 et l'histone désacétylase HDAC1 en réduisant l'activité répressive de Gro (Choi, et al. 2005; Lee, et al. 2009). La phosphorylation peut intéresser aussi le domaine WD, en plus du domaine SP ; c'est le cas des modifications apportées par la MAPK (*mitogen activated protein kinase*) en réponse à la voie de signalisation activée par EGFR (*epidermal growth factor receptor*); à nouveau cette modification diminue l'activité de Gro (Cinnamon, et al. 2008; Hasson, et al. 2005; Hellmann, et al. 2011). Pour compléter le cadre, il est bien de souligner que la phosphorylation des membres de la famille Grg/TLE peut être également induite par des facteurs de transcription tels que HES-1, RUNX1, Pax5 et BF-1 (Eberhard, et al. 2000; Nuthall, Husain, et al. 2002).

Groucho peut aussi subir une autre modification post-traductionnelle, celle de la SUMOylation. La liaison de peptides SUMO-1 à quatre lysines de Groucho en augmente l'activité répressive, en favorisant l'interaction avec HDAC1 (Ahn, et al. 2009). Selon une étude réalisée dans les cellules souches neuronales de rat, TLE1/Grg1 se trouverait dans

un complexe de protéines constitué par la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1), la topo-isomérase IIb, la nucléoline, la nucléophosmine et la protéine réparatrice de l'ADN Rad50 (Ju, et al. 2004). L'activation de PARP-1 par CAMKII δ (*Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*) provoque l'ADP-ribosylation de TLE1/Grg1 et les facteurs associés, ce qui entraîne la dissociation de Hes-1 et la conséquente perte de répression. Enfin, dans une publication récente il a été démontré que l'enzyme OGT, responsable de la modification post-traductionnelle d'O-GlcNAcylation, interagit directement avec Gro/TLE et que cela conduit à la suppression de la voie de signalisation médiée par Wnt (Wu, et al. 2014).

6.7.2 Présence du motif peptidique

Gro est recruté sur le filament d'ADN près des autres répresseurs après avoir reconnu une courte séquence peptidique présente sur ces derniers : le motif WRPW (Caballero, et al. 2003). Ce motif n'est pas présent sur tous les co-répresseurs de Gro et d'ailleurs il peut être muté. Les deux membres de la famille de facteurs de transcription Runx, Runx et Lz (*Lozenge*), sont requis pour le recrutement de Gro, cependant ils contiennent la séquence VWRPY à l'extrémité carboxylique (Kagoshima, et al. 1993). Un autre exemple est donné par le facteur Huckebein (Hkb) qui réprime la transcription suite à interaction avec Gro et possède une séquence FRPW, cette dernière ne se localisant pas à l'extrémité carboxylique mais plutôt à l'intérieure de la protéine (Goldstein, et al. 1999). Enfin, EH-1 (*Engrailed homology domain 1*) recrute Gro grâce à une séquence consensus très conservée et bien différente par rapport à la séquence WRPW habituelle. Cette séquence consiste en sept résidus aminés, tel que FxIxxIL (Jimenez, et al. 1999; Tolkunova, et al. 1998).

6.7.3 Liaison avec des facteurs accessoires

L'interaction directe entre le facteur de transcription et le co-répresseur Gro n'est parfois pas suffisante et la présence d'un troisième acteur est requise. C'est le cas du Lz qui peut se comporter à la fois comme un répresseur et comme un activateur. Cela dépend de la présence du homo-domaine accessoire Cut. Cut est capable de reconnaître la séquence riche en AT présente sur Lz et sa présence est nécessaire pour stabiliser l'interaction entre Gro et Lz. Ainsi Lz peut exercer son activité répressive seulement s'il est dans un complexe stable (Canon and Banerjee 2003). D'une façon similaire, *Dorsal*, déjà décrit précédemment, interagit avec Gro pas seulement grâce au domaine RHD mais aussi en

présence du domaine CTD, qui montre une forte homologie avec le motif Eh 1 (Flores-Saaib, et al. 2001).

6.8 Isoformes

Si chez la Drosophile et le nématode *C. elegans* un seul gène Groucho a été identifié, 4 homologues TLE sont présents dans le génome des mammifères : TLE1-4 (Li 2000). Ces isoformes sont aussi connues sous le nom de grandes protéines TLE. TLE3 se localise sur le chromosome 15 et ne montre aucun paralogue. Au contraire, TLE1 et TLE4 sont issues d'une duplication et pour cette raison ils se situent en tandem sur le même chromosome 9 : chr9q21.32 pour TLE1 et chr9q21.31 pour TLE4. Les phénomènes de duplication sont fréquents dans le génome de vertébraux (Spring 1997). Selon le modèle classique, une des deux copies dégénère et est perdue alors que plus rarement elle acquiert une nouvelle fonctionnalité et est sélectionnée pour être conservée dans le génome (phénomène de neo-fonctionnalisation).

TLE2 se localise sur le chromosome 19 et présente environ 22 différents transcrits (*splice variants*). Près du locus de TLE2, il y a un autre gène dont la séquence est faiblement similaire à celle de la famille Groucho/TLE : il s'agit de Grg6 ou TLE6. A cause de sa structure tronquée, les domaines WDR de Grg6/TLE6 montrent seulement 50% de similarité avec les membres TLE de grande taille. Cette isoforme semble être issue de la duplication du gène TLE2 (Aghaallaei, et al. 2005). Compte tenu de l'absence de l'extrémité aminique, Grg6/TLE6 n'est pas capable de former des hétérodimères avec les autres protéines TLE ni d'interagir avec HDAC ; cependant, elle interagit et régule d'une façon négative la protéine BF-1 (*brain factor-1*) et cela est considéré comme un effet du phénomène de neo-fonctionnalisation (Marcal, et al. 2005). Dans les mammifères, la protéine tronquée AES/Grg5 se localise aussi en tandem avec le gène TLE2 ; du point de vue de leur évolution, les deux sont très proches. De plus, comme les grandes protéines TLE, AES/Grg5 contient sept exons très fortement conservés entre les domaines Q et GP (Bajoghli 2007). Cependant, AES/Grg5 ne fonctionne pas comme un co-répresseur et ceci semble être dû à l'incapacité d'interagir avec HDAC (Brantjes, et al. 2001).

6.9 FONCTIONS BIOLOGIQUES

Compte tenu de la complexité de cette famille, par la suite nous nous focaliserons davantage sur TLE1, en se limitant à donner les détails principaux pour les autres membres.

6.9.1 Implication dans le cancer

Une expression accrue des membres de la famille Gro/TLE est détectée dans plusieurs cancers, tels que le carcinome du colon et cervical, l'astrocytome et le méningiome (Cuevas, et al. 2005; Liu, et al. 1996; Rorive, et al. 2006; Zagouras, et al. 1995). Compte tenu de la forte corrélation entre le niveau d'expression de Gro/TLE et certains cancers, l'expression de ces protéines s'affirme de plus en plus comme un marqueur valable pour des cancers humains spécifiques qui sont pour l'instant définis seulement d'un point de vue morphologique et pas moléculaire.

6.9.1a Sarcome synovial

Le sarcome synovial est un cancer des tissus mous caractérisé par une translocation chromosomique. L'expression de Gro/TLE1 et Gro/TLE2 est élevée dans ce type de sarcome par rapport aux autres. D'ailleurs, l'expression de Gro/TLE1 corrèle avec le 97% des sarcomes synoviales (Allander, et al. 2002; Terry, et al. 2007).

6.9.1b Adénocarcinome du poumon

La surexpression de Gro/TLE1 dans des souris transgéniques induit l'apparition de l'adénocarcinome du poumon, alors que la surexpression de Grg5 ne provoque pas cet effet (Allen, et al. 2006). En accord avec cette spécificité, le niveau de Gro/TLE1 est augmenté dans 20% de cas d'adénocarcinome du poumon chez l'homme. Le développement de cette tumeur, chez les souris transgéniques sur-exprimant Gro/TLE1, est associé à une induction du récepteur tyrosine kinase Erb1 et Erb2. Un profil similaire d'induction d'Erb2 a été observé dans le sarcome synovial humain (Allander, et al. 2002). D'une façon intéressante, une corrélation inverse est observée entre le niveau d'expression de Ras/MAPK et celui de Gro/TLE1 dans l'adénocarcinome de poumon qui suggère que Gro/TLE1 pourrait induire ce type de tumeur d'une façon indépendante de l'activation de la voie de signalisation Ras/MAPK (Allen, et al. 2006).

6.9.2 Implication dans l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus qui permet le renouvellement des cellules sanguines comme les lymphocytes B. Le rôle de Grg4/TLE4 dans ce type cellulaire a été bien étudié en démontrant que l'ARN messager de TLE4 est élevé dans les lymphocytes B et diminue lors de leur activation par le LPS et/ou l'IL-4 (Linderson, et al. 2004; Milili, et al. 2002). De plus, il a été démontré que l'activité répressive de Pax5, un facteur crucial dans les lymphocytes B, est diminuée suite à l'interaction physique avec TLE4 (Eberhard, et al. 2000). TLE1 de son côté, interagit avec la protéine PRH (*proline-rich homeodomain*) qui est connue aussi sous le nom de Hex (*hematopoietically expressed*) (Swingler, et al. 2004). Cette protéine fonctionne comme un répresseur de la transcription dans le système hématopoïétique, le foie et la thyroïde (Brickman, et al. 2000; Guiral, et al. 2001; Pellizzari, et al. 2000). TLE1 est capable d'en augmenter l'activité répressive, qui peut être à la fois diminuée par Grg5. Runx1 est un autre facteur important dans le processus d'hématopoïèse chez la souris et son interaction avec TLE1 réprime la transactivation des gènes contrôlés par Runx1 (Levanon, et al. 2002).

6.9.3 Implication dans la myogénese

La myogénese est le processus qui conduit à la formation du tissu musculaire. La différenciation des myoblastes est régulée par une balance entre le facteur promouvant la myogénese MyoD et l'antagoniste MyoR (Lu, et al. 1999). L'interaction de TLE1 avec Hes6 est responsable de la dérégulation de MyoR et le conséquent avancement du processus de la myogénese. Ceci a été démontré pour les myoblastes en culture (Gao, et al. 2001).

6.9.4 Implication dans le système nerveux

Le processus dans lequel le rôle des membres de la famille Gro/TLE a été le mieux décrit est celui du développement du système nerveux. TLE1 en particulier interagit avec Hes-1, ce dernier étant connu pour sa capacité à diminuer la différenciation des neurones ; en fait, sa délétion provoque une différenciation prématurée des neurones et une induction des gènes pro-neuronaux (Ishibashi, et al. 1995; Ishibashi, et al. 1994). Plusieurs études ont pu mettre en évidence l'interaction entre TLE1 et Hes-1 : d'abord les deux protéines ont des profils d'expression très similaires dans les cellules neuronales souches et cette expression diminue lors de leur maturation (Sasai, et al. 1992). Ainsi, les deux protéines interagissent physiquement *in vitro* et forment un complexe constitué par 13 polypeptides

qui contribue à l'activité répressive de Hes-1 (Ju, et al. 2004). Enfin, Hes-1 peut induire la phosphorylation de TLE en agissant sur la kinase CK2 en augmentant ainsi l'action répressive de TLE1 (Nuthall, Husain, et al. 2002). Plus récemment, Dastidar et collègues ont décrit TLE1 comme un acteur promouvant la survie des neurones. Dans le mécanisme proposé par les auteurs, TLE1 est phosphorylé par CK2 et fonctionne comme un dimère qui interagit avec le répresseur FoxG1 (*Forkhead box G1*). Grg5 induirait la mort des neurones suite à compétition avec FoxG1 dans le but d'hétérodimériser avec TLE1. Grg6 conduirait également à la mort des neurones via l'interaction directe avec FoxG1 (Dastidar, et al. 2012).

Les autres membres de la famille Gro sont fortement exprimés dans le système nerveux central et sont impliqués dans son développement ; cependant, leur rôle est moins caractérisé que celui de TLE1.

6.9.5 Implication dans l'apoptose

Le processus selon lequel les cellules meurent suite au détachement de la matrice extracellulaire est connu sous le nom de « anoikis » (Frisch and Screaton 2001). Une protéine a été décrite comme ayant un rôle protecteur contre ce phénomène : c'est la protéine Bcl-2 (Frisch 1999). Il a été démontré qu'un niveau élevé de TLE1 protégerait les cellules de lymphome du phénomène d'anoikis, avec un effet favorable sur la progression de la tumeur (Shipp, et al. 2002). Au contraire, la protéine mitochondriale Bit1, une fois relâchée par les mitochondries forme un complexe avec AES qui favorise l'apoptose. L'action pro-apoptotique du complexe Bit1-AES peut être réprimée par deux mécanismes différents: TLE1 peut réduire l'interaction entre Bit1 et AES (Brunquell, et al. 2012) ou d'autre part, le complexe Bit1-AES serait capable de réguler d'une façon négative les propriétés anti-apoptotiques de TLE1 (Jan, et al. 2004). Plus récemment cette action anti-apoptotique de TLE1 a été mise en évidence dans une lignée des cellules humaines de sarcome synovial (Seo, et al. 2011). Lorsque l'expression de TLE1 est réduite par une approche de *silencing*, l'expression de Bcl-2 est également diminuée avec des conséquences pour la mort cellulaire.

6.9.6 Implication dans la réponse inflammatoire

Un travail réalisé par le groupe de David Sweetser a montré que la stimulation *in vitro* des macrophages péritonéaux des souris Grg1-KO avec les ligands de TLR induit une production accrue de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que IL6 et TNF α . Cet

effet inhibiteur de TLE1 sur l'inflammation est du à la répression de la translocation dans le noyau de NFκB dans la lignée cellulaire THP-1 en réponse au traitement avec le LPS (Ramasamy S, poster 1197 presented at 54th ASH Annual Meeting and Exposition 2012). Il a été démontré que TLE1 et AES interagissent avec la sous-unité p65 de NFκB et que ceci cause la réduction de l'expression des gènes contrôlés par NFκB (Tetsuka, et al. 2000). TLE1 est aussi capable d'interagir avec Sirt1, une désacetylase NAD-dépendante qui agit sur les histones ainsi que sur NFκB. Sirt1 nécessite de l'interaction avec TLE1 pour inhiber l'activité de NFκB comme TLE1 réprime NFκB seulement suite à l'interaction avec Sirt1 (Ghosh, et al. 2007).

6.9.7 Implication dans le diabète

Le diabète de type 2 est du au développement d'une résistance à l'insuline et à une hyperglycémie. Des études ont été réalisées sur plusieurs cohortes d'individus pour évaluer la présence de variantes génétiques qui prédisposent à l'apparition du diabète de type 2. Les résultats ont mis en évidence l'existence de polymorphismes au niveau du nucléotide simple (*single nucleotide polymorphism*, SNP) dans le gène codant pour TLE1 qui prédisposeraient au développement du diabète de type 2 et du diabète gestationnel. Ces données suggèrent une implication potentielle de TLE1 dans cette pathologie (Harder, et al. 2013; Huopio, et al. 2013). En parallèle, il est connu que parmi les membres de la famille Gro, Grg3 est le plus exprimé dans le pancréas (Hoffman, et al. 2008; Metzger, et al. 2012) et son niveau d'expression est beaucoup plus important dans les cellules β-pancréatiques par rapport aux cellules α (Metzger, et al. 2014). D'ailleurs, grâce à des expériences conduites sur des souris déficientes pour un des deux allèles codant pour Grg3, il a été démontré que Grg3 participe à la transformation des cellules β en cellules mono-hormonales *via* le recrutement du facteur Nkx6.1 sur le promoteur du gène codant pour le glucagon dans le but d'en réprimer l'expression (Metzger, et al. 2014). Ces données sont renforcées par l'observation que Grg3 fonctionne en synergie avec Pdx1 pour induire la sécrétion de l'insuline après stimulation avec le glucose. Cette régulation est vérifiée aussi chez l'homme (Metzger, et al. 2014).

6.9.8 Implication dans les monocytes

Très peu de données sont au jour d'aujourd'hui disponibles concernant les membres de la famille Gro/TLE dans les monocytes/macrophages. Sykes et collègues (Sykes, et al. 2003) ont utilisé des lignées immortalisées de progéniteurs myéloïdes de neutrophiles (ECoM-G) et monocytes (ECoM-M) qui ont été traitées pour inactiver l'oncoprotéine chimérique E2a-Pbx1. Cette protéine est connue pour empêcher la différenciation des progéniteurs myéloïdes et les auteurs démontrent que l'expression de TLE1 est fortement diminuée dans ECoM-G et ECoM-M lorsque E2a-Pbx1 est inactivée. Ce résultat met en évidence le rôle hypothétique de TLE1 dans l'immortalisation des neutrophiles et monocytes. En fait, E2a-Pbx1 par soi même n'affecte pas l'expression des facteurs de transcription myéloïdes. Toutefois, il augmente l'expression des corépresseurs, tels que TLE1, qui agissent sur ces gènes, de telle façon à bloquer la prolifération cellulaire. Un travail publié récemment (Larabee, et al. 2013) a montré que les protéines Gro sont impliquées dans la voie de signalisation de Notch qui d'ailleurs possède un rôle clef dans la régulation des activités des macrophages. Cette voie de signalisation est activée dans les macrophages murins et dans les monocytes humains, par l'AMPc qui induit aussi les gènes cibles de Notch. En fait, l'AMPc favorise la formation du complexe TLE/Hes1 qui va réguler certains effets de Notch.

Pour conclure, le rôle de TLE1 dans les monocytes/macrophages n'a pas encore été clarifié et c'est ce que nous comptons faire au cours de ce travail de thèse.

OBJECTIFS

Dans la partie bibliographique de ce manuscrit j'ai décrit comment les macrophages, grâce à leur plasticité, puissent acquérir des phénotypes fonctionnels extrêmement différents. Il apparaît maintenant clair que la proportion relative de macrophages présentant divers phénotypes peut avoir des conséquences dans le développement de pathologies telles que l'athérosclérose, l'obésité ou encore le cancer. Il est donc important de pouvoir caractériser en détail les signatures moléculaires associées aux différents phénotypes fonctionnels afin d'établir les facteurs qui pourraient être clé dans la détermination d'un phénotype donné. Cette caractérisation globale a été réalisée au laboratoire en utilisant comme modèle d'étude des macrophages primaires humains issus de la différenciation des monocytes sanguins différenciés *in vitro* en absence ou en présence d'IL4, ce qui a donné lieu respectivement à des macrophages non polarisés RM et à des macrophages M2. A partir des données issues de l'analyse globale du génome des macrophages RM et M2 en utilisant la technologie Affymetrix, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'expression des facteurs de transcription différemment régulés entre macrophages RM et macrophages alternatifs M2. Nos résultats ont mis en évidence que NOR1 (*Neuron-derived Orphan Receptor 1*) et TLE1 (*Transducin Like Enhancer of Split 1*) sont parmi les facteurs dont l'expression est la plus induite dans les macrophages alternatifs. En particulier TLE1 est le troisième et NOR1 est le quatrième facteur parmi les plus induits dans les macrophages alternatifs. L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser en détail l'expression et d'étudier les fonctions potentielles de ces deux facteurs de transcription dans les macrophages alternatifs humains, en utilisant différentes approches expérimentaux *in vitro* et *ex vivo*.

RESULTATS

Article 1 : The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype

Contexte bibliographique et résumé de l'étude

Ce travail réalisé au cours de la première partie de ma thèse porte sur l'étude du rôle de NOR1 dans les macrophages alternatifs et a donné lieu à une publication soumise avec révision favorable à la revue scientifique « Atherosclerosis ».

Une analyse transcriptomique réalisée par notre laboratoire a mis en évidence NOR1 comme étant parmi les facteurs de transcription les plus exprimés dans les macrophages M2 humains, comparativement aux macrophages non polarisés. Ces macrophages M2 sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et dans le remodelage tissulaire. Le récepteur nucléaire orphelin NOR1, tout comme les deux autres membres de la famille NR4A, est exprimé dans les macrophages de la lésion athéromateuse chez l'homme. Les données relatives à l'implication de ces NR4A dans la polarisation des macrophages sont peu nombreuses et contradictoires. Dans un premier temps, deux groupes de recherche avaient démontré une action anti-athérogène de Nur77 grâce à sa capacité à promouvoir le phénotype alternatif des macrophages (Hamers, et al. 2012; Hanna, et al. 2012). Seulement un an après, Chao et collègues ont démontré l'absence de relation entre la délétion de Nur77 et le changement dans le phénotype des macrophages ainsi que dans le développement de l'athérosclérose (Chao, et al. 2013).

Le but de ce travail était de comprendre l'implication potentielle de NOR1 dans l'acquisition du phénotype alternatif des macrophages humains. Compte tenu du fait que NOR1 est un récepteur nucléaire orphelin et qu'aucun ligand n'est connu à ce jour, nous avons utilisé deux approches pour en étudier les fonctions dans les macrophages : celle de diminuer son expression par un siRNA spécifique et celle de la surexpression par infection adénovirale.

Nos résultats montrent pour la première fois que NOR1 est fortement exprimé dans les macrophages alternatifs M2 humains *in vivo* et *in vitro* et que son expression est sous le contrôle direct du facteur de transcription STAT6, médiateur principal de la voie de signalisation de l'IL-4. Par la suite, nous montrons que NOR1 induit l'expression de certains marqueurs M2, tels que MR, F13A1, IL-1Ra, IL-10 et PPAR γ laissant suggérer qu'il est nécessaire mais pas suffisant pour médier la polarisation alternative. Par ailleurs, des analyses bioinformatiques nous ont permis d'identifier des éléments de réponse de NOR1 dans les promoteurs de certains marqueurs de la polarisation alternative (F13A1, IL-10 et IL-1Ra), ce

qui suggère que ces gènes peuvent être potentiellement régulés de façon directe par NOR1. Afin d'avoir une vision plus globale de l'implication de NOR1 dans la modulation du phénotype M2 des macrophages, nous avons utilisé l'approche d'analyse du génome entier des macrophages alternatifs humains grâce à la technique des puces à ADN. Ainsi, des macrophages M2 de cinq sujets volontaires ont été transfectés avec un siRNA scrambled ou un siNOR1. Ces résultats ont été couplés aux données issues d'une autre étude à large échelle réalisée au laboratoire sur les gènes différemment régulés entre macrophages non polarisés et macrophages M2. Cette approche nous a permis d'étudier comment les gènes très fortement exprimés dans les macrophages alternatifs sont modulés par le siNOR1. Nous montrons que globalement NOR1 augmente l'expression de gènes très fortement exprimés dans les macrophages M2.

Par la suite notre intérêt s'est porté sur le gène codant pour la métalloprotéinase de la matrice 9 (MMP9) un de gènes les plus induits suite à la transfection avec le siNOR1. La MMP9 est une enzyme produite par les macrophages et les neutrophiles – granulocytes impliquée dans la dégradation de la matrice et des interactions intra-cellulaires. Elle est plutôt connue comme étant un marqueur pro-inflammatoire des macrophages M1. D'ailleurs, nous avons démontré que NOR1 diminue l'expression et l'activité enzymatique de MMP9. Par ailleurs, le promoteur de ce gène contient des éléments de réponse de NOR1 ; ainsi ce gène semble être lui aussi directement régulé par NOR1. L'ensemble de nos résultats identifie NOR1 comme un nouveau modulateur du phénotype des macrophages. En conclusion, NOR1 augmente l'expression des marqueurs de la polarisation alternative et diminue l'expression de la MMP9 impliquée dans la destabilisation de la plaque d'athérosclérose.

The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1) is induced upon human alternative macrophage polarization and stimulates the expression of markers of the M2 phenotype

F. De Paoli^{1,2,3,4}, J. Eeckhoutte^{1,2,3,4}, C. Copin^{1,2,3,4}, J. Vanhoutte^{1,2,3,4}, C. Duhem^{1,2,3,4}, B. Derudas^{1,2,3,4}, J. Dubois-Chevalier^{1,2,3,4}, S. Colin^{1,2,3,4}, C. Zawadzki^{1,5}, B. Jude^{1,5}, S. Haulon⁵, P. Lefebvre^{1,2,3,4}, B. Staels^{1,2,3,4}, G. Chinetti-Gbaguidi^{1,2,3,4,6}

¹ Université Lille 2, F-59000, Lille, France

² Inserm, U1011, F-59000, Lille, France

³ Institut Pasteur de Lille, F-59019, Lille, France

⁴ European Genomic Institute for Diabetes (EGID), FR 3508, F-59000 Lille, France

⁵ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, France

⁶ INSERM, U 1081, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), "Aging and Diabetes" team, France, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice, France and Clinical Chemistry Laboratory, University Hospital, Nice, France

Address correspondence to:

Bart Staels

Inserm UR 1011, Institut Pasteur de Lille

1, rue du Professeur Calmette,

BP 245, Lille 59019, France

Tel: +33-3-20-87-73-88

Fax: +33-3-20-87-73-60

E-mail : bart.staels@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Background: Atherosclerosis is an inflammatory disease in which macrophages play a crucial role. Macrophages are present in different phenotypes, with at the extremes of the spectrum the classical M1 pro-inflammatory and the alternative M2 anti-inflammatory macrophages. The neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1), together with Nur77 and Nurr1, are members of the NR4A orphan nuclear receptor family, expressed in human atherosclerotic lesion macrophages. However, the role of NOR1 in human macrophages has not been studied yet.

Objectives: To determine the expression and the functions of NOR1 in human alternative macrophages.

Methods and Results: *In vitro* IL-4 polarization of primary monocytes into alternative M2 macrophages enhances NOR1 expression in human but not in mouse macrophages, likely via STAT6 binding to a response element in the human NOR1 promoter, as demonstrated by electrophoretic mobility shift assays. Moreover, NOR1 expression is most abundant in CD68+MR+ alternative macrophage-enriched areas of human atherosclerotic plaques *in vivo*. Silencing NOR1 in human alternative macrophages decreases the expression of several M2 markers such as the Mannose Receptor (MR), Interleukin-1 Receptor antagonist (IL-1Ra), CD200 Receptor (CD200R), coagulation factor XIII A1 polypeptide (F13A1), Interleukin 10 (IL-10) and the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) γ . Bioinformatical analysis identified F13A1, IL-1Ra, IL-10 and the Matrix Metalloproteinase-9 (MMP9) as potential target genes of NOR1 in human alternative macrophages. Moreover, expression and enzymatic activity of MMP9 are induced by silencing and repress by overexpression of NOR1 in M2 macrophages.

Conclusions: These data identify NOR1 as a transcription factor induced during alternative differentiation of human macrophages and demonstrate that NOR1 modifies the alternative macrophage phenotype.

INTRODUCTION

Macrophages are immune cells present in different functional phenotypes. Among the described phenotypes, two macrophage sub-populations have received particular attention: the Th1-polarized pro-inflammatory classical M1 macrophages which exert tumoricidal activities and contribute to the immune response, and the alternative M2 macrophages polarized by Th2 cytokines, mostly involved in the resolution of inflammation and tissue remodelling (1). In addition, depending on the environmental stimuli, several distinct alternatively activated macrophage sub-types can be distinguished: M2a, M2b and M2c, among which M2a macrophages are induced by IL4 and IL13 (2). Macrophages play key roles in atherosclerosis development. Different alternative macrophage subtypes have been identified in human atherosclerotic lesions based on the expression of specific surface markers. We have previously demonstrated the presence of a sub-population of alternative macrophages co-expressing the pan-macrophage marker CD68 and the alternative marker mannose receptor (MR) in areas other than the pro-inflammatory CD68+MR- macrophages which are more closely located to the lipid core of the atherosclerotic lesions (3). CD68+MR+ alternative macrophages as well as other macrophage subpopulations have been also found in areas of hemorrhage and angiogenesis (4). For instance M(Hb) macrophages (5), characterized by high expression levels of CD163 and low levels of HLA-DR are enriched in hemorrhagic zones. Moreover, haemoglobin ingestion by monocytes gives rise to Mhem macrophages with high surface expression of the M2 markers MR and CD163 (6, 7).

Macrophage functions are regulated by transcription factors, among which several members of the nuclear hormone receptor 4A (NR4A) subfamily: the Neuron-derived clone-77 (Nur77, NR4A1, also referred to as NGFI-B), the Nuclear receptor-related 1 (Nurr1, NR4A2) and the Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1, NR4A3 also referred to as MINOR) (8). NR4A family members are classified as orphan receptors, since their ligand-binding pocket comprises aromatic residues impeding ligand fixation (9-11). They are constitutively active and operate in a ligand-independent manner (12). Their expression and activity level is modulated by transcriptional and post-translational modifications. NR4As are early response genes rapidly induced by multiple stimuli (LPS, oxidized LDL, cAMP, shear stress) (13, 14) and highly expressed in energy-dependent tissues, as well as in vascular smooth muscle cells (VSMC), endothelial cells (EC) and in macrophages resident in human atherosclerotic lesions (15). Nur77 mediates the pro-inflammatory response in macrophages via the NF κ B pathway (16) and by activating the inducible kinase IKKi (17). NOR1 has been suggested to be pro-atherogenic since it promotes human and murine VSMC and EC proliferation (18)(19) and

induces the expression of VCAM-1 and ICAM-1 in EC thus enhancing monocyte adhesion (20). In contrast, macrophage NOR1 seems to play a protective role in atherogenesis, since it inhibits the inflammatory response of macrophages as well as their ability to transform into foam-cells (15). In line with this observation, NOR1 deletion in hematopoietic cells accelerates atherosclerosis progression by increasing macrophage infiltration and proliferation in atherosclerotic lesions (21). Moreover, expression of NOR1 has been recently described in murine mast cells, where it controls the cell response to allergens (22).

The role of NR4A receptors in monocyte/macrophage polarization has been investigated mainly in mice. Macrophages from *Nur77*^{-/-} mice show modifications in the expression of M2-specific markers with a shift toward a pro-inflammatory phenotype, exhibiting increased expression of M1-markers such as interleukin-12, interferon- γ and nitric oxide synthase (23, 24). However, these results have been challenged by another study showing that NOR1 and *Nur77* are not dominant actors in M2 macrophage polarization in the mouse (25).

To date, whether NR4A nuclear receptors play a role in the alternative polarization of human macrophages is still unknown.

MATERIAL AND METHODS

Human Atherosclerotic plaques

Human atherosclerotic plaques were removed from consenting patients eligible for surgical carotid endarterectomy recruited at the Cardiovascular Surgery Department, Hospital of Lille, France.

Cell culture

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation (26). Resting macrophages (RM) were obtained after 6 days of culture in RPMI 1640 medium (Invitrogen, France) supplemented with gentamicin (40 µg/mL), L-glutamine (2 mmol/L; Sigma-Aldrich, France) and 10% pooled human serum (Abcys, France). To obtain alternative differentiated macrophages (M2), recombinant human IL-4 (15 ng/mL; Promocell, Germany) was added at the beginning of differentiation and then maintained for 6 days.

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained from C57BL/6J mice differentiated in RPMI 1640 containing 25mmol HEPES supplemented with 10% low endotoxin FBS, 15% L929-conditioned medium, 2mmol L-glutamine, 1mmol gentamycine. Stimulation with IL-4 (15 ng/mL) was carried out during 6 days (27).

Immunohistochemical analysis and laser capture microdissection (LCM)

Carotid atherosclerotic plaques were frozen in liquid nitrogen immediately after endarterectomy. A fragment of the plaque was used for total RNA extraction. For immunohistochemical analysis performed on serial 10 µm-cryosections, endogenous peroxidase activity was quenched. Endothelial cells were detected by anti-PECAM1/CD31 (Novus Biological), smooth muscle cells by anti- α -actin, and macrophages by anti-CD68 antibodies (Dako), using N-Histofine Simple Stain (Nichirei Biosciences Inc). PECAM1/CD31 was revealed by blue staining (BCIP/NBT; Vector), α -actin by grey precipitate (Vector SG), and CD68 by red staining (Vector Nova Red). Adjacent sections were stained with goat polyclonal anti-human MR (SantaCruz) and mouse anti-human NOR1 antibody (abcam), both revealed by red staining (Vector Nova Red). Negative control for NOR1 staining was performed using isotype matched control IgG (Abcam).

Adjacent cryosections of atherosclerotic plaques containing macrophage sub-populations defined as expressing (CD68+MR+) or not the MR protein (CD68+MR-), were prepared for

laser capture microdissection (LCM) performed on an ArcturusXT Microdissection Instrument with CapSure Macro LCM Caps (MDS Analytical Technologies). Macrophage-rich areas were captured from 3 adjacent 10 μ m-sections and pooled for RNA extraction (4).

RNA extraction and analysis

Total cellular RNA was extracted using Trizol (Life Technologies, France) and from human whole atherosclerotic plaques by the acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform method (28). RNA extraction from LCM-isolated samples was performed using the Picopure RNA extraction kit (MDS Analytical Technologies) (29). RNA quality was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Only samples displaying a RNA Integrity Number (RIN) ≥ 6 were used for further RNA analysis. RNA was amplified in 2 rounds using the ExpressArt TRinucleotide mRNA amplification Nano kit (AmpTec GmbH). For quantitative PCR, RNA was reverse-transcribed using random hexamer primers and Superscript reverse transcriptase (Life Technologies) and cDNAs were quantified on a MX3000 apparatus (Stratagene) using specific primers (Supplemental Table 1). mRNA levels were normalized to those of cyclophilin. The relative expression of each gene was calculated by the Δ Ct method, where Δ Ct is the value obtained by subtracting the Ct (cycle threshold) value of cyclophilin mRNA from the Ct value of the target gene. The amount of target relative to the cyclophilin mRNA was expressed as $2^{-\Delta\text{Ct}}$.

siRNA-mediated RNA interference

Smart pool siRNA oligonucleotides corresponding to human NOR1 (Dharmacon Thermo Scientific) and scrambled control RNA (Ambion) were used. At the sixth day of differentiation, M2 macrophages were transfected using Dharmafect4 reagent (Dharmacon Thermo Scientific) in serum-free RPMI medium for 16 hours. The transfection medium was then replaced with fresh serum-free RPMI medium and the incubation continued for an additional 24 or 48 hours.

Adenovirus-mediated NOR1 overexpression

The pAdCMV-rNor1 was generated as previously described (30). For the infection experiments, RM macrophages were seeded in six-well plates at a density of 10^6 cells/well and viral particles were added at a multiplicity of infection (MOI) of 100 for 18 hours. Thereafter, cells were washed once with PBS and incubated in fresh serum-free RPMI medium supplemented with IL-4 (15 ng/mL) for an additional 24 hours.

Protein Extraction and Western Blot Analysis

Cells were harvested in lysis buffer containing PBS, 1% Triton X100 (Sigma), 0.5% Na deoxycholate (Sigma), 10 mmol/L Na pyrophosphate (Aldrich), 2 mmol/L Na vanadate (Fluka), 100 mmol/L Na Fluoride (Fluka) and 1X protease inhibitors (Roche). Cells were then centrifuged at 13000 rpm for 25 minutes at 4°C, the supernatant was recovered and proteins quantified by the Peterson method. For IL-10 measurement, collected cell supernatants were treated with 0.02% Na deoxycholate (Sigma); after 30 minutes incubation on ice, 15-20% trichloroacetate (Merck) was added and samples were incubated ON at 4°C. After 10min centrifugation at 15000 g, the pellet was resuspended in 600 µL of cold acetone. This step was repeated twice and the pellet was then dried at room temperature before adding Laemmli buffer and boiled for 10 minutes. Proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to Hybond-C Extra membranes (Amersham), and immunoblotted using antibodies against human MR and PPAR γ (Santa Cruz Biotechnology), NOR1, F13A1, CD200R, IL1Ra, IL10 (all from Abcam), MMP9 (Sigma), and β -actin (Santa Cruz Biotechnology). After incubation with appropriate secondary peroxidase-conjugated antibodies, immunoreactive bands were revealed using a chemiluminescence ECL detection kit (Amersham). Signals of band intensities for IL-10 were normalized to the cellular protein content (mg/ml).

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

For the preparation of nuclear extracts, RM and M2 macrophages were collected in hypotonic buffer (10 mmol/L Hepes pH 7.8, 10 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 0.1 mmol/L EDTA, 3 mmol/L dithiothreitol, 10 mmol/L Na pyrophosphate, 1 mmol/L Na vanadate, 50 mmol/L Na fluoride and protease inhibitors). After 15 minutes of incubation at 4°C, nonidet P40 was added before centrifugation. The cell pellet was dissolved in hypertonic buffer (50 mmol/L Hepes pH 7.8, 50 mmol/L KCl, 300 mmol/L NaCl, 3 mmol/L dithiothreitol, 10% glycerol and protease inhibitors); after 30 minutes of incubation at 4°C, samples were cleared by centrifugation. The supernatant was designated as nuclear extract and the protein concentration was determined (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Nuclear extracts were incubated for 10 minutes in binding buffer (20 mmol/L Hepes pH 7.9, 40 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EGTA, 4% Ficoll, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 1 mmol/L MgCl₂) containing poly(dI-dC) (2.5 µg). For oligonucleotide competition assays, an excess of cold oligonucleotides was added to the binding reaction. Double-stranded oligonucleotides containing the wild type and the mutated STAT6 response element (STAT-6RE) present

between nucleotides -1402 and -1376 of the human NOR1 promoter, end-labeled using T4 polynucleotide kinase and ^{-32}P ATP, was added as probe to the binding reaction. A double-stranded oligonucleotide containing a STAT6 binding element present in the human IL-1Ra gene promoter (IL-1Ra SBE1) was used as positive control (31). DNA/protein complexes were resolved by 5% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis in 0.25 Tris-Borate-EDTA.

Microarray studies

RNA samples of siNOR1 and siRNA scrambled transfected-M2 macrophages from 5 different donors were isolated by RNeasy kits (Qiagen), evaluated for quantity and quality using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies) and subsequently processed using HG-U133 Affymetrix Genechips. The raw microarray data were analysed using the Partek software to generate a single expression value for each probe set in each sample. A paired *t*-test was used to assess how likely changes in differential expression occurred by chance (threshold $p=0.05$). Signal intensity ratios and *p* values were calculated for each probe set allowing the identification of genes differentially expressed between siRNA scrambled-M2 and siNOR1-M2 samples. The minimum cut-off in intensity per gene was set at 1.2-fold change (FC).

Measurement of MMP9 enzymatic activity

MMP9 activity was determined in culture medium of siNOR1 and siRNA scrambled-M2 macrophages by a fluorimetric assay using a commercial ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN) designed to quantify the amount of active MMP9 reflecting metalloproteinase enzymatic activity.

Bioinformatical analysis

The presence of NGFBI response elements (NBRE, motifs bound by NOR1) and STAT6 responsive elements (STAT6-RE) was searched using the Genomatix software suite. focusing on regions competent for transcription factor binding, defined as regions enriched for the active histone mark H3K9ac in human macrophages and bound by master regulators of macrophage differentiation and functions (EGR2, PU1 and/or CEBPB) as judged using direct visual inspection of chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq data (32).

Statistical analysis

Pearson correlation coefficients (R^2) were calculated from Q-PCR ΔC_t data. Statistical differences between groups were analyzed by Wilcoxon signed-rank test or Student's t test and considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

NOR1 is highly expressed in primary human, but not in mouse alternative M2 macrophages

To investigate the potential role of the NR4A family members in the differentiation of human monocytes toward alternative macrophages, the expression of Nurr1, Nur77 and NOR1 was compared between unpolarized resting macrophages (RM) and IL-4 polarized M2 alternative macrophages. The expression level of the three NR4As members in monocytes at day 1 was comparable (Ct value 27). However, during *in vitro* differentiation, only NOR1 gene expression showed a significant induction by IL-4 (Figure 1A). Western blot analysis performed in RM and M2 macrophages derived from two independent donors showed also a strong induction of NOR1 protein levels in M2 macrophages compared to RM macrophages (Figure 1B). By contrast, gene expression of both Nurr1 and Nur77 decreased during the alternative differentiation process (Figure 1C and 1D) and was almost absent in M2 macrophages compared to NOR1 expression (NOR1 mean Ct value: 25; Nurr1 mean Ct value: 32; Nur77 mean Ct value: 31; Supplemental Figure 1). To investigate whether the induction of NOR1 expression in M2 macrophages occurs also in mice, BMDM were treated during 6 days with IL-4. NOR1 expression was similar between M2 and unpolarized RM macrophages (Figure 1E). As positive control, Ym1/2, a marker of alternative polarization in mice (33) was highly induced in alternative differentiated BMDM (Figure 1F).

NOR1 is a direct target of STAT6 in primary human alternative M2 macrophages

Since expression of NOR1 was strongly induced by IL-4, a cytokine that operates via activation of the STAT6 signalling pathway (34), we determined whether NOR1 can be directly regulated by STAT6. The human NOR1 promoter was analyzed *in silico* using the Genomatix software suite. Among the 5 STAT6-REs identified, a putative functional site was selected since present in a chromatin region competent for transcription factor recruitment (between nucleotides 1379 and 1398) (Supplemental Figure 2A). Indeed, this region shows enrichment for the active histone mark H3K9ac in human macrophages and is bound by master regulators of macrophage differentiation and is functional as judged from ChIP-seq data (EGR2, PU1 and/or CEBPB) (32).

An EMSA was performed using nuclear extracts from RM and M2 macrophages to test for binding of STAT6 to the selected responsive element. Incubation of the labeled STAT6-RE oligonucleotide with nuclear extracts from RM and M2 macrophages resulted in the formation

of a retarded complex, evident in M2 macrophages (lane 3) and not in RM macrophages (lane 2) (supplemental Figure 2B, indicated by the arrow). Incubation with cold STAT6-RE resulted in competition of fixation (lanes 4 and 5), while a mutated cold STAT6-RE did not compete (lane 6 and 7), thus indicating the specificity of the binding. Consensus STAT6-RE (lane 8 - 10) and mutated STAT6-RE (lane 11 - 13) probes were used as positive and negative control, respectively. All together the results from EMSA indicate that STAT6 can directly bind to the human NOR1 promoter.

NOR1 is highly expressed in alternative macrophages *in vivo*

Since NOR1 appears as the unique NR4A member to be induced during alternative polarization *in vitro*, we analysed its expression also *in vivo* in human atherosclerotic plaques. It has been previously reported that all the NR4A receptors are expressed in early and advanced human aortic atherosclerotic lesion macrophages (15). However, given the fact that different macrophage sub-populations are present in human atherosclerotic plaques, we investigated whether NOR1 expression differs between plaque macrophage sub-types, i.e. CD68+MR+ and CD68+MR- macrophages. Q-PCR analysis of RNA extracted from the whole atherosclerotic plaques showed that the expression of NOR1 strongly correlates with the expression of the alternative macrophage marker MR (Figure 2A). Moreover, histological analysis showed that NOR1 expression in human carotid atherosclerotic lesions *in vivo* predominantly co-localizes with the macrophage marker CD68 as well as with MR (Figure 2B and 2C). Q-PCR analysis of macrophage-enriched areas isolated by LCM showed that the mRNA levels of NOR1 are higher in zones of alternative CD68+MR+ macrophages compared to zones enriched in CD68+MR- macrophages (Figure 2D). Moreover, NOR1 expression in the CD68+MR+ macrophage-enriched zones was higher than the other two members of the NR4A subfamily (NOR1 $2^{-\Delta Ct}$ value: 11.45; Nurr1 $2^{-\Delta Ct}$ value: 2.82; Nur77 $2^{-\Delta Ct}$ value: 2.83). All together, these results demonstrate that NOR1 is expressed *in vivo* in alternative macrophages of human atherosclerotic plaques.

NOR1 silencing in alternative macrophages decreases the expression of M2 markers

Since NOR1 is an orphan receptor, we employed a knock-down approach using specific siRNA, validated by Q-PCR and western blot analysis, to investigate its potential functions in alternative macrophages (Figure 3A). NOR1 knock-down was between 47% and 90% (depending on the donor) and there was no compensatory upregulation of the other two members of the NR4A subfamily (Supplemental Figure 3A and 3B). Q-PCR and western blot

analysis revealed that NOR1 knock-down resulted in a significant decrease in the expression of a panel of alternative polarization markers such as MR (Figure 3B), F13A1 (Figure 3C), PPAR γ (Figure 3D), CD200R (Figure 3E), IL-10 (Figure 3F) and IL-1Ra (Figure 3G), compared to scrambled siRNA transfected cells. The mRNA expression of 28S, housekeeping gene, was not affected (Figure 3H) confirming the specificity of the regulation of the alternative markers. Expression of other M2 markers, such as CD163 and AMAC1, was not regulated by NOR1 (Supplemental Figure 4A and 4B). Moreover, bioinformatic analysis identified several NOR1 response elements (NBRE) in the F13A1, IL-1Ra and IL-10 promoters, suggesting a potential direct regulation of these genes by NOR1 (Supplemental Figure 5A-C). All together, these results indicate that NOR1 enhances the alternative phenotype in human macrophages.

NOR1 silencing decreases the expression of human M2 macrophage - enriched genes

To assess the potential action of NOR1 in alternative macrophages, a whole genome microarray analysis was performed on RNA from M2 macrophages isolated from 5 different donors upon knock-down of NOR1 expression by a specific siRNA or transfected with scrambled siRNA at the end of differentiation. Using as criteria of analysis, a fold change (FC) ≥ 1.2 and $p \leq 0.05$, 1181 genes were identified as differently regulated by NOR1: 564 up-regulated and 617 down-regulated (Supplemental Figure 6). To gain insight into the role of NOR1 in the alternative polarization process, the impact of NOR1 on the expression of genes, whose expression is highly enriched in M2 compared to RM macrophages identified by microarray analysis, was analysed by assessing their regulation upon siNOR1 knock-down. Based on selection criteria of FC > 5 and p-value < 0.05 , 132 genes were selected as higher expressed in M2 macrophages compared to RM macrophages. The expression of these 132 selected genes was then analysed in the data set obtained from NOR1 knock-down experiments. Our results show that the expression of genes (red spots) was respectively positively and negatively modulated by NOR1 knock-down (MA-plot, green spots correspond to genes with a p-value > 0.05 and red spots represent genes with a p-value < 0.05 , Supplemental Figure 7A). Furthermore, when the p-value is set as < 0.05 , 29 genes shown a significant down-regulation after siNOR1 knock-down (Supplemental Figure 7B) compared to 7 genes that were up-regulated. The expression of four of the most highly regulated genes among the 29 decreased by NOR1 siRNA (cholesterol 25-hydroxylase (CH25H), coagulation factor 13A type 1 (F13A1), Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32), (FCGR2B) and mitogen-activated protein kinase kinase 6, (MAP2K6) was further confirmed by Q-PCR,

analysis (Supplemental Figure 8). These results further support a role for NOR1 in human alternative macrophages by enhancing the expression of genes highly expressed in M2 macrophages.

NOR1 silencing increases MMP9 expression and activity in alternative macrophages

Among the 10 most up-regulated genes after siNOR1 knock-down in M2 macrophages resulting from the whole genome microarray analysis, matrix metalloproteinase 9 (MMP9) was identified (see supplemental table 2). Since MMP9, a collagenase belonging to the zinc-dependent proteolytic enzyme family, is involved in extra-cellular matrix degradation (35) and thus plays a role in atherosclerotic plaque stability (36), we focused our attention on this gene. Q-PCR analysis confirmed the induction of MMP9 mRNA in NOR1 siRNA-transfected macrophages, an effect also observed at the protein level for both the zymogen pro-MMP9 and the functional active MMP9 forms (Figure 4A). In line with the regulation of MMP9 expression, the amount of active MMP9, reflecting its enzymatic activity, increased in siNOR1 transfected M2 macrophages compared to scrambled siRNA transfected cells (Figure 4B). Gain of function experiments demonstrate that MMP9 gene expression is reduced by adenovirus-mediated NOR1 over-expression in RM macrophages treated with IL-4 for 24 hours after infection (Figure 4C). Furthermore, bioinformatic analysis of the human MMP9 promoter identified a potential NBRE site (Supplemental Figure 9). By contrast, mRNA levels of other MMPs, such as MMP7 and MMP8, were not affected upon NOR1 down-regulation (Supplemental Figure 10A and 10B). Expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), the natural enzyme inhibitor of MMP9 and negative regulator of pro-MMP9 activation (37), was not regulated in siNOR1-transfected M2 macrophages (Figure 4D).

DISCUSSION

The nuclear receptors of the NR4A family, Nur1, Nur77 and NOR1 are expressed in macrophages *in vitro* as well as *in vivo* in macrophages resident in human atherosclerotic lesions. NR4As were detected by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in macrophages localized in the shoulder regions or infiltrating the media (15). In human macrophages, NR4A receptors have been reported to control the inflammatory response and cholesterol metabolism (38).

The role of NR4A receptors in macrophage polarization has been recently studied in mice, with controversial results. Nur77 deletion has been shown to enhance the polarization of macrophages toward a M1 phenotype resulting in an increased development of atherosclerotic lesions in LDL-R deficient mice (23, 24). However, these data have been challenged by another study reporting that Nur77-deficiency does not confer any M1 response to macrophages and is without effect on atherosclerosis development (25). Very few data are available regarding a possible implication of NOR1 in alternative polarization in mouse macrophages. BMDM isolated from NOR1-null mice displayed less induction of the pro-inflammatory inducible nitric oxide synthase (iNOS) when stimulated with LPS (25), while induction of IL-6 and TNF α was not affected. Furthermore, no data are available regarding the regulation of M2 marker expression in NOR1-deficient macrophages, with the exception of IL-10 which tends to decrease in NOR1 null macrophages under basal conditions (25).

However, the expression and potential role of NR4As in human macrophages with an alternative phenotype was not investigated yet. In this study we show that of the three members of the NR4A family, NOR1 is the only one induced upon alternative differentiation induced by IL-4 (Figure 1A). Interestingly, by bioinformatical analysis several response elements for STAT6, the mediator of IL-4 signalling pathways, were identified in the human NOR1 promoter and we demonstrated, by electrophoretic mobility shift assay, that STAT6 can directly bind to the human NOR1 promoter in M2 macrophages. We also reported that alternative CD68⁺MR⁺ macrophages in human atherosclerotic plaques express higher levels of NOR1 compared to the CD68⁺MR⁻ macrophage-enriched areas.

In vitro silencing of NOR1 expression in human IL-4-driven alternative macrophages leads to a modification of their phenotype. Indeed, the expression of several alternative macrophage markers, such as MR, IL-1Ra, CD200R, F13A1, IL-10 and PPAR γ decreases in the absence of NOR1. These results suggest that NOR1 can modulate the phenotype of human alternative macrophages induced by IL-4.

Interestingly, we found that NOR1 silencing in primary human alternative macrophages leads to higher expression and activity of MMP9, a metalloproteinase known to be highly expressed in the classical-activated pro-inflammatory M1 macrophages (39). MMP9 is involved in structural remodelling of vessels as well as tissue plasticity through partial degradation of matrix, cell-matrix and cell-cell interactions (40, 41). High expression of MMP9 was observed in advanced complicated atherosclerotic carotid plaques (type VI lesions), especially in the shoulder regions, which are more prone to instability and subsequent rupture (42). A decreased NOR1 expression in M2 macrophages enhances the production of active MMP9, thus leading to a macrophage phenotype more oriented to matrix degradation. We can thus speculate that NOR1 might play a role in plaque vulnerability. Indeed, by antagonizing collagen and matrix degradation, NOR1 could be involved in atherosclerotic lesion stability. Interestingly, recent literature suggests that the balance between M1 and M2 macrophages may have consequences for plaque stability (43). The majority of macrophages resident in symptomatic unstable plaques display a M1 phenotype, while asymptomatic plaques predominantly contain M2 polarized macrophages (44), suggesting that plaque instability may be the consequence of an imbalance between the M1 and M2 phenotype. According to our results, NOR1 could be a potential actor in the maintenance of the balance between M1 and M2 macrophage phenotypes in advanced plaque, by enhancing the expression of M2 markers and by decreasing the activity of MMP9, an enzyme involved in plaque destabilization.

CONCLUSION

We have demonstrated that NOR1 plays a crucial role in the regulation of the macrophage phenotype in humans, suggesting that if in the future it will be possible to modulate its expression, it could be an interesting pharmacological target for the control of the balance between M1 and M2 macrophages in the plaques.

ACKNOWLEDGMENTS

M. Fanchon and L. Belloy are acknowledged for their technical help. We thank F. Pinet (Lille) for providing the anti MMP9 antibody, R. Paumelle for providing BMDM samples and M. Ploton for providing NOR1 adenovirus. Grants from the Région Nord-Pas de Calais/FEDER (CPER N. 1449), the Agence Nationale de la Recherche, France (ALMHA project), the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale, the “European Genomic Institute for Diabetes” (EGID, ANR-10-LABX-46) are acknowledged. B. Staels is a member of the Institut Universitaire de France.

REFERENCES

1. Chinetti-Gbaguidi, G., Colin, S., and Staels, B. 2014. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*.
2. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686.
3. Bouhrel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dievart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., et al. 2007. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism* 6:137-143.
4. Bories, G., Colin, S., Vanhoutte, J., Derudas, B., Copin, C., Fanchon, M., Daoudi, M., Belloy, L., Haulon, S., Zawadzki, C., et al. 2013. Liver X Receptor (LXR) Activation Stimulates Iron Export in Human Alternative Macrophages. *Circ Res* 113:1196-1205.
5. Finn, A.V., Nakano, M., Polavarapu, R., Karmali, V., Saeed, O., Zhao, X., Yazdani, S., Otsuka, F., Davis, T., Habib, A., et al. 2012. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 59:166-177.
6. Boyle, J.J., Harrington, H.A., Piper, E., Elderfield, K., Stark, J., Landis, R.C., and Haskard, D.O. 2009. Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype. *Am J Pathol* 174:1097-1108.
7. Boyle, J.J., Johns, M., Kampfer, T., Nguyen, A.T., Game, L., Schaer, D.J., Mason, J.C., and Haskard, D.O. 2012. Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. *Circ Res* 110:20-33.
8. Maruyama, K., Tsukada, T., Ohkura, N., Bando, S., Hosono, T., and Yamaguchi, K. 1998. The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* 12:1237-1243.
9. Wansa, K.D., Harris, J.M., and Muscat, G.E. 2002. The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem* 277:33001-33011.
10. Wansa, K.D., Harris, J.M., Yan, G., Ordentlich, P., and Muscat, G.E. 2003. The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem* 278:24776-24790.
11. Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N.P., and Perlmann, T. 2003. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555-560.
12. Wilson, T.E., Fahrner, T.J., Johnston, M., and Milbrandt, J. 1991. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300.
13. Maxwell, M.A., and Muscat, G.E. 2006. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002.
14. Pols, T.W., Bonta, P.I., and de Vries, C.J. 2007. NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? *Curr Opin Lipidol* 18:515-520.
15. Bonta, P.I., van Tiel, C.M., Vos, M., Pols, T.W., van Thienen, J.V., Ferreira, V., Arkenbout, E.K., Seppen, J., Spek, C.A., van der Poll, T., et al. 2006. Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2288-2294.

16. Pei, L., Castrillo, A., Chen, M., Hoffmann, A., and Tontonoz, P. 2005. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 280:29256-29262.
17. Pei, L., Waki, H., Vaitheesvaran, B., Wilpitz, D.C., Kurland, I.J., and Tontonoz, P. 2006. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med* 12:1048-1055.
18. Rodriguez-Calvo, R., Guadall, A., Calvayrac, O., Navarro, M.A., Alonso, J., Ferran, B., de Diego, A., Muniesa, P., Osada, J., Rodriguez, C., et al. 2013. Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet* 22:1949-1959.
19. Martinez-Gonzalez, J., Rius, J., Castello, A., Cases-Langhoff, C., and Badimon, L. 2003. Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 92:96-103.
20. Zhao, Y., Howatt, D.A., Gizard, F., Nomiyama, T., Findeisen, H.M., Heywood, E.B., Jones, K.L., Conneely, O.M., Daugherty, A., and Bruemmer, D. 2010. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circ Res* 107:501-511.
21. Qing, H., Liu, Y., Zhao, Y., Aono, J., Jones, K.L., Heywood, E.B., Howatt, D., Binkley, C.M., Daugherty, A., Liang, Y., et al. 2014. Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in hematopoietic stem cells accelerates atherosclerosis. *Stem Cells* 32:2419-2429.
22. Garcia-Faroldi, G., Melo, F.R., Bruemmer, D., Conneely, O.M., Pejler, G., and Lundequist, A. 2014. Nuclear receptor 4a3 (nr4a3) regulates murine mast cell responses and granule content. *PLoS One* 9:e89311.
23. Hamers, A.A., Vos, M., Rassam, F., Marinkovic, G., Kurakula, K., van Gorp, P.J., de Winther, M.P., Gijbels, M.J., de Waard, V., and de Vries, C.J. 2012. Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ Res* 110:428-438.
24. Hanna, R.N., Shaked, I., Hubbeling, H.G., Punt, J.A., Wu, R., Herrley, E., Zaugg, C., Pei, H., Geissmann, F., Ley, K., et al. 2012. NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res* 110:416-427.
25. Chao, L.C., Soto, E., Hong, C., Ito, A., Pei, L., Chawla, A., Conneely, O.M., Tangirala, R.K., Evans, R.M., and Tontonoz, P. 2013. Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice. *J Lipid Res* 54:806-815.
26. Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Pineda Torra, I., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J.C., Chapman, J., Najib, J., and Staels, B. 1998. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 273:25573-25580.
27. Cudejko, C., Wouters, K., Fuentes, L., Hannou, S.A., Paquet, C., Bantubungi, K., Bouchaert, E., Vanhoutte, J., Fleury, S., Remy, P., et al. 2011. p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* 118:2556-2566.
28. Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
29. Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhrel, M.A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., et al. 2011. Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High

- Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR{gamma} and LXRα Pathways. *Circ Res* 108:985-995.
30. Briand, O., Helleboid-Chapman, A., Ploton, M., Hennuyer, N., Carpentier, R., Pattou, F., Vandewalle, B., Moerman, E., Gmyr, V., Kerr-Conte, J., et al. 2012. The nuclear orphan receptor Nur77 is a lipotoxicity sensor regulating glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 26:399-413.
 31. Ohmori, Y., Smith, M.F., Jr., and Hamilton, T.A. 1996. IL-4-induced expression of the IL-1 receptor antagonist gene is mediated by STAT6. *J Immunol* 157:2058-2065.
 32. Chinetti-Gbaguidi, G., Bouhlef, M.A., Copin, C., Duhem, C., Derudas, B., Neve, B., Noel, B., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P., Seckl, J.R., et al. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation induces 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in human alternative macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:677-685.
 33. Raes, G., Noel, W., Beschin, A., Brys, L., de Baetselier, P., and Hassanzadeh, G.H. 2002. FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages. *Dev Immunol* 9:151-159.
 34. Lim, W.S., Timmins, J.M., Seimon, T.A., Sadler, A., Kolodgie, F.D., Virmani, R., and Tabas, I. 2008. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation* 117:940-951.
 35. Puolakkainen, P., Koski, A., Vainionpaa, S., Shen, Z., Repo, H., Kempainen, E., Mustonen, H., and Seppanen, H. 2014. Anti-inflammatory macrophages activate invasion in pancreatic adenocarcinoma by increasing the MMP9 and ADAM8 expression. *Med Oncol* 31:884.
 36. Newby, A.C. 2006. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol* 17:556-561.
 37. Ogata, Y., Itoh, Y., and Nagase, H. 1995. Steps involved in activation of the pro-matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B)-tissue inhibitor of metalloproteinases-1 complex by 4-aminophenylmercuric acetate and proteinases. *J Biol Chem* 270:18506-18511.
 38. van Tiel, C.M., and de Vries, C.J. 2012. NR4All in the vessel wall. *J Steroid Biochem Mol Biol* 130:186-193.
 39. Min, D., Moore, A.G., Bain, M.A., Breit, S.N., and Lyons, J.G. 2002. Activation of macrophage promatrix metalloproteinase-9 by lipopolysaccharide-associated proteinases. *J Immunol* 168:2449-2455.
 40. Pasterkamp, G., Schoneveld, A.H., Hijnen, D.J., de Kleijn, D.P., Teepen, H., van der Wal, A.C., and Borst, C. 2000. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteinases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis* 150:245-253.
 41. Shah, P.K., Falk, E., Badimon, J.J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J.T., Regnstrom, J., and Fuster, V. 1995. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92:1565-1569.
 42. Stintzing, S., Heuschmann, P., Barbera, L., Ocker, M., Jung, A., Kirchner, T., and Neureiter, D. 2005. Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with Chlamydia pneumoniae, inflammation, and apoptosis. *Ann Vasc Surg* 19:310-319.
 43. Stoger, J.L., Gijbels, M.J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C.M., Biessen, E.A., Daemen, M.J., Lutgens, E., and de Winther, M.P. 2012. Distribution of

- macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225:461-468.
44. Cho, K.Y., Miyoshi, H., Kuroda, S., Yasuda, H., Kamiyama, K., Nakagawara, J., Takigami, M., Kondo, T., and Atsumi, T. 2013. The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22:910-918.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. NOR1 is highly expressed in primary human but not in mouse alternative M2 macrophages. **A, C and D.** Q-PCR analysis of NOR1 (**A**), Nurr1 (**C**) and Nur77 (**D**) mRNA in RM and M2 macrophages during differentiation (day 1 and day 6). Results are normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to macrophages at day 1 set at 1. Data are representative of 3 independent experiments. **B,** Expression of NOR1 protein analyzed by western blot in differentiated RM and M2 macrophages obtained from 2 different donors. **E and F.** Q-PCR analysis of NOR1 (**E**) and Ym1/2 (**F**) in BMDM polarized to M2 or RM macrophages for 6 days. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to RM set at 1. Results are representative of 2 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 2. NOR1 is highly expressed in alternative macrophages *in vivo*. **A,** Pearson correlation coefficient (R^2) is calculated from qPCR Δ Ct data from atherosclerotic tissue specimens derived from 16 subjects. **B,** Representative immunostaining for CD68 (red), PECAM-1/CD31 (blue), α -smooth muscle actin (α -SMA, grey) in human carotid atherosclerotic lesions. MR staining (red) and NOR1 staining (red) are also presented. **C,** Higher magnification for CD68, NOR1 and MR staining on adjacent sections. Scale bars are shown. **D,** Q-PCR analysis of NOR1 performed on RNA from LCM-isolated CD68+MR+ and CD68+MR- macrophage-rich areas isolated from 5 atherosclerotic plaques. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed relative to the levels in CD68+MR- area set at 1. Each point corresponds to a single atherosclerotic plaque. The median value is shown. Statistically significance was assessed by the Wilcoxon signed-rank test.

Figure 3. NOR1 silencing decreases the expression of alternative polarization markers in human alternative macrophages. **A-H,** Q-PCR analysis of NOR1 (**A**), MR (**B**), F13A1 (**C**), PPAR γ (**D**), CD200R (**E**), IL-10 (**F**), IL-1Ra (**G**) and 28S (**H**) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to scrambled-transfected M2 macrophages set at 1. Results are representative of 5 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **A-G,** NOR1 (**A**), MR (**B**), F13A1 (**C**), PPAR γ (**D**),

CD200R (E), IL-10 (F) and IL1Ra (G) protein expression analyzed by western blot in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1, representative of 2 independent experiments. Immunoreactive band intensity was quantified and normalized to the intensity of scrambled transfected cells set at 1.

Figure 4. NOR1 regulates MMP9 expression and activity in human alternative macrophages. **A and D**, Q-PCR analysis of MMP9 (**A**) and TIMP1 (**D**) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to non-transfected M2 macrophages set at 1. Results are representative of 4 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; *** $p < 0.001$). **A**, MMP9 and pro-MMP9 protein expression analyzed by western blot in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1. **B**, MMP9 activity was measured by a fluorimetric assay in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1. Data are expressed as means \pm SD and are representative of 4 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; * $p < 0.05$, ns: non significant). **C**, Q-PCR analysis of MMP9 mRNA in RM macrophages infected with NOR1 adenovirus (ad-NOR1) or control GFP (ad-GFP) adenovirus and then treated with IL-4 during 24 hours. mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to RM macrophages infected with ad-GFP and treated with IL-4 set at 1. Results are representative of 3 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; * $p < 0.05$).

Supplemental figure 1. NOR1 is expressed at higher levels in M2 macrophages than Nurr1 and Nur77. Q-PCR analysis of NOR1, Nurr1 and Nur77 mRNA in M2 macrophages normalized to cyclophilin mRNA. Data are expressed as means \pm SD relative to NOR1 expression in M2 macrophages set at 1, representative of 4 independent experiments. Statistically significant differences are indicated (t test; *** $p < 0.001$).

Supplemental figure 2. NOR1 is a direct target of STAT6 in primary human alternative M2 macrophages. **A**, Schematic representation of the potentially functional STAT6-RE motif in human NOR1 promoter. **B**, Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) performed on nuclear extracts from RM and M2 macrophages in the presence of labelled STAT6-RE oligonucleotides. Competition experiments were performed by adding 10 and 50-fold excess of cold STAT6-RE or mutated STAT6-RE oligonucleotides.

Supplemental figure 3. NOR1 silencing does not affect Nur77 nor Nurr1 expression. **A** and **B**, Q-PCR analysis of Nur77 (**A**) and Nurr1 (**B**) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1 normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to non-transfected M2 macrophages set at 1, representative of 3 independent experiments. (ns: non significant).

Supplemental figure 4. NOR1 silencing does not affect CD163 nor AMAC1 expression. **A** and **B**, Q-PCR analysis of CD163 (**A**) and AMAC1 (**B**) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1 normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to non-transfected M2 macrophages set at 1, representative of 5 independent experiments. (ns: non significant).

Supplemental figure 5. F13A1, IL-10 and IL-1Ra are potential direct target genes of NOR1. A-C, Schematic representation of the NBRE, the motif bound by NOR1, in the promoters of the alternative polarization markers F13A1 (**A**), IL-1Ra (**B**) and IL-10 (**C**).

Supplemental figure 6. Representations of microarray results. **A.** Heat map of the fold change of genes regulated in siNOR1 M2 macrophages compared to scrambled siRNA transfected cells derived from 5 donors. Colours fluctuate from red (strongly negative regulated) to green (highly positive regulated). The number of regulated genes is indicated. **B.** Plotting of the fold change of genes regulated in siNOR1 M2 macrophages compared to scrambled siRNA transfected cells calculated as a mean of the values derived from 5 donors. Criteria for analysis have been described in Materials and Methods.

Supplemental figure 7. NOR1 silencing decreases the expression of genes highly expressed in M2 macrophages. **A.** MA-plot (M for log ratios and A for mean average) of genes highly expressed in M2 macrophages and affected by NOR1 knock-down. A total of 132 genes have been selected to be highly expressed in M2 macrophages compared to RM macrophages (FC > 5 and p-value < 0.05) resulting from unpublished microarray study. The expression level of these 132 genes in M2 macrophages has been further analysed after siNOR1 knock-down. Green dots represent genes with a p-value > 0.05 and red dots genes with a p-value < 0.05. **B.** Table of the 29 genes highly expressed in M2 macrophages and whose expression is significantly decreased after siNOR1 knock-down (p-value < 0.05).

Supplemental figure 8. Q-PCR validation of the 4 most regulated genes among the 29 down-regulated after NOR1 silencing. Q-PCR analysis of CH25H (A), F13A1 (B), FCGR2B (C) and MAP2K6 (D) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1 normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to non-transfected M2 macrophages set at 1. Results are representative of 5 independent experiments (t test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Supplemental figure 9. MMP9 is a potential direct target gene of NOR1. A-C, Schematic representation of the NBRE in the human MMP9 promoter.

Supplemental figure 10. NOR1 silencing does not affect MMP7 nor MMP8 expression. A-B, Q-PCR analysis of MMP7 (A) and MMP8 (B) mRNA in M2 macrophages transfected with scrambled or siNOR1 normalized to cyclophilin mRNA and expressed as means \pm SD relative to non-transfected M2 macrophages set at 1. Results are representative of 4 independent experiments. (ns: non significant).

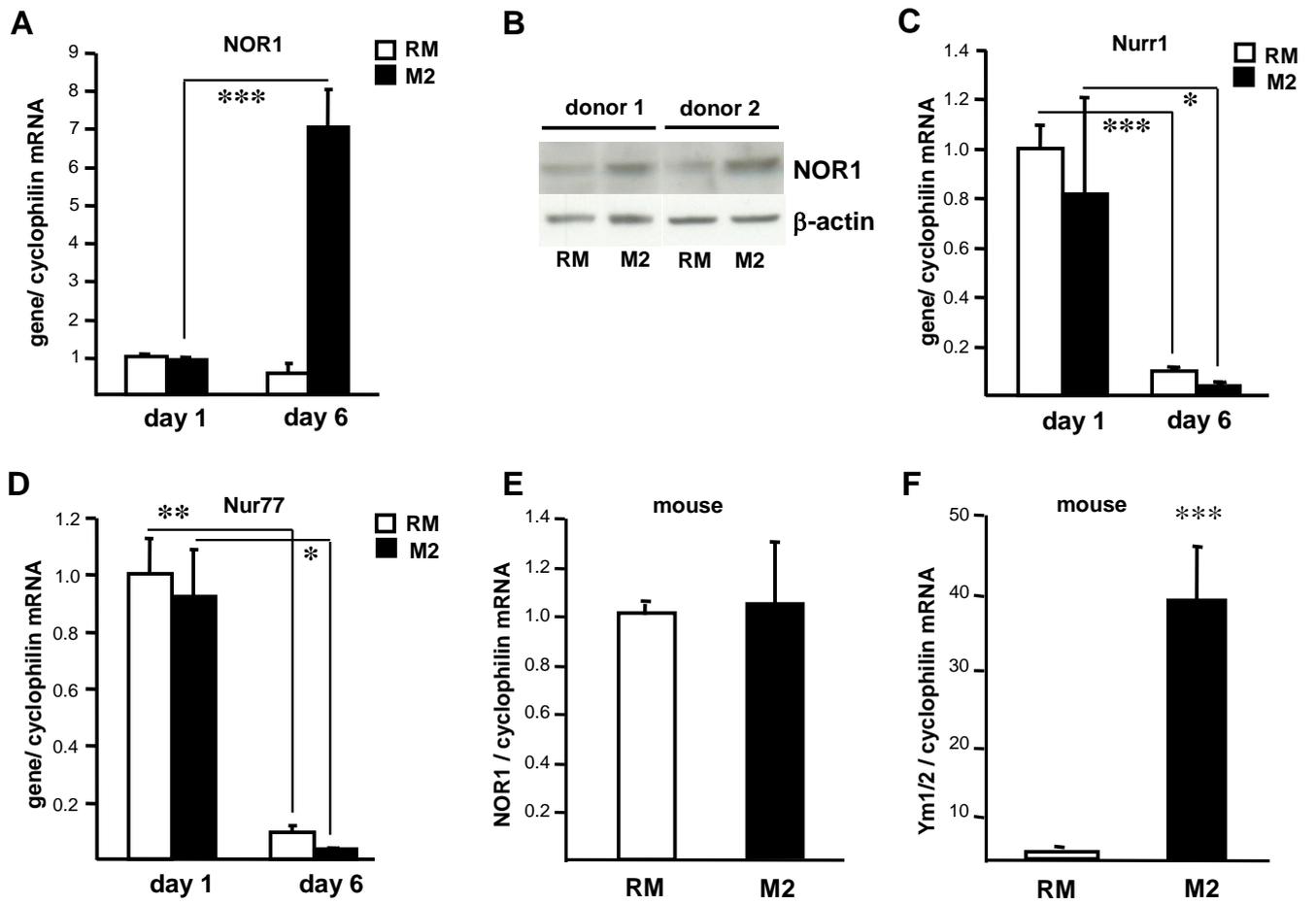


Figure 1

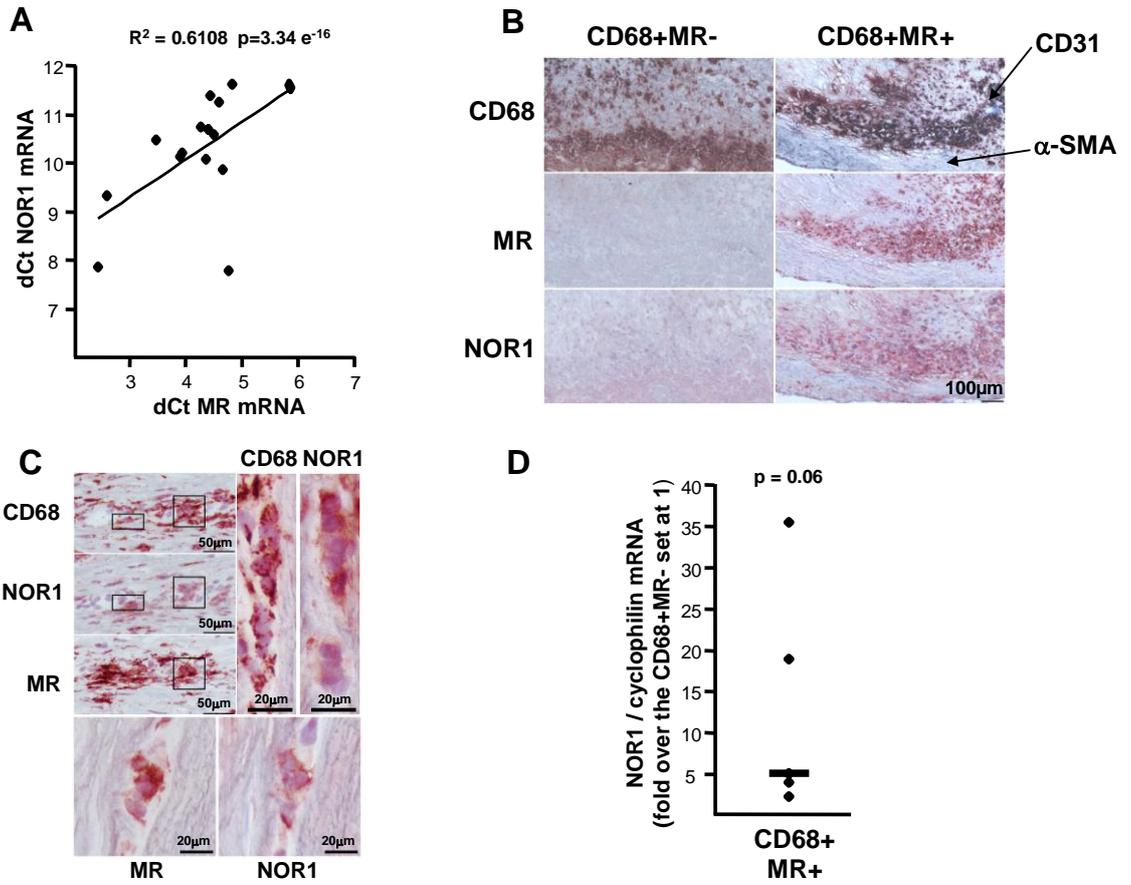


Figure 2

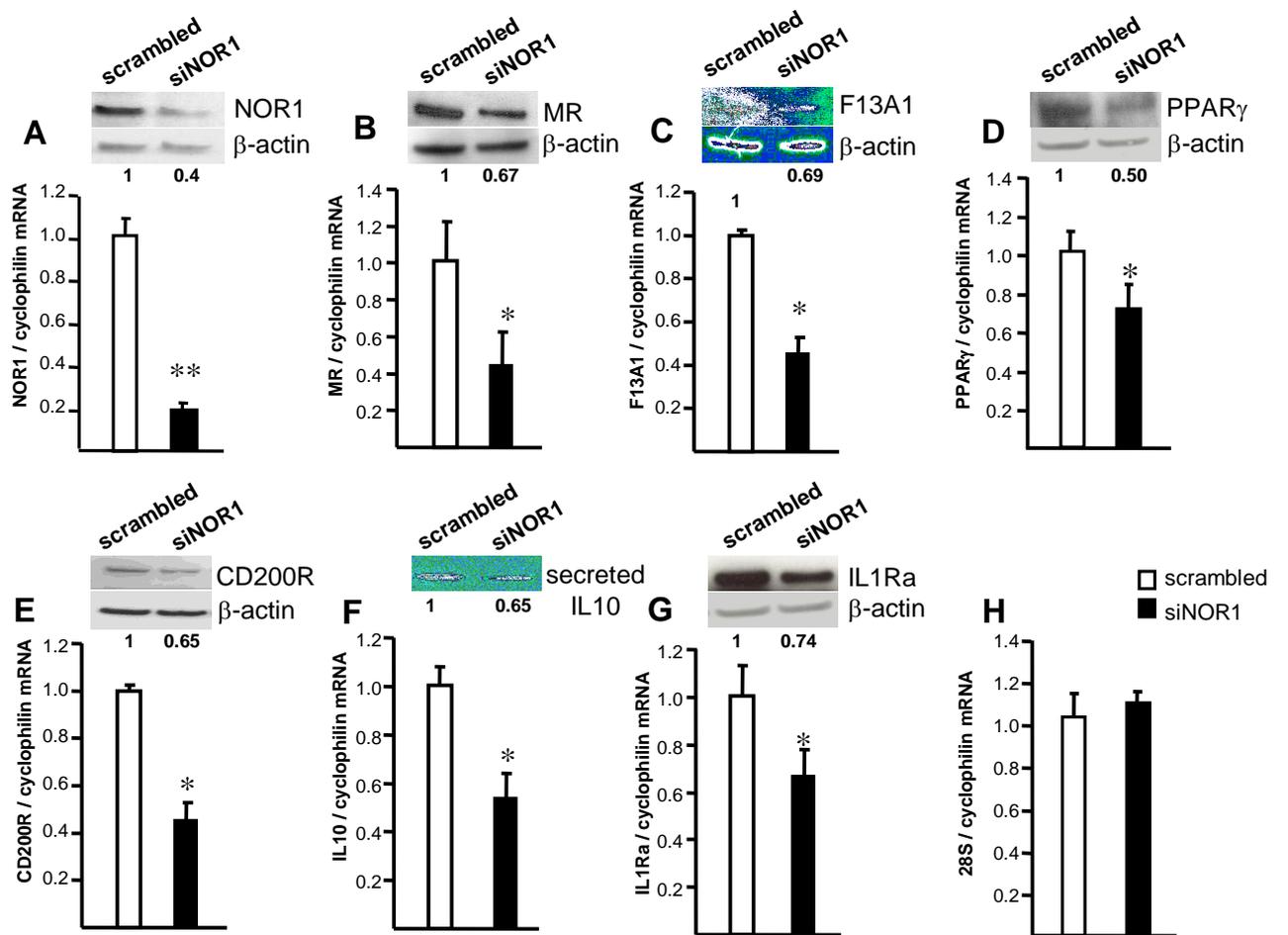


Figure 3

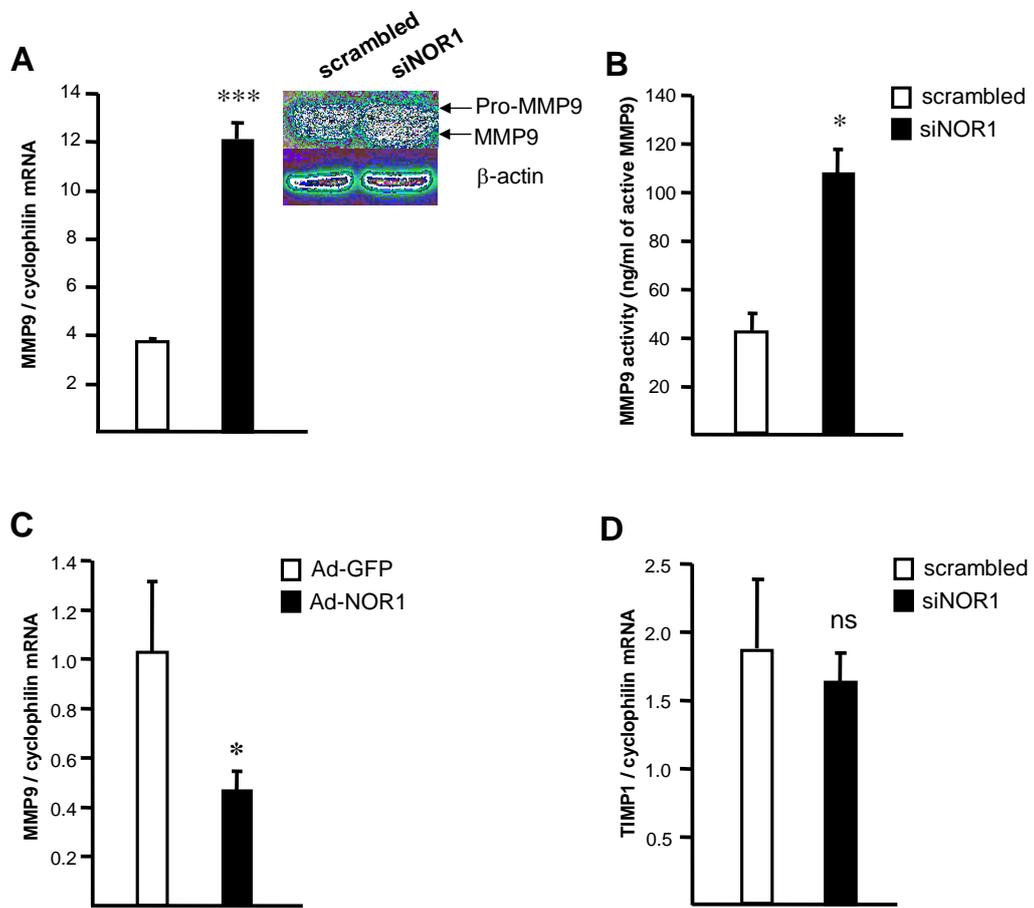
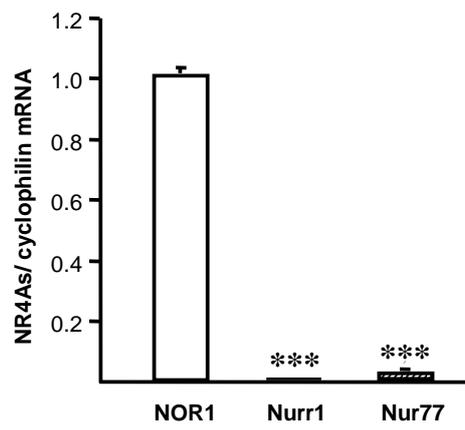
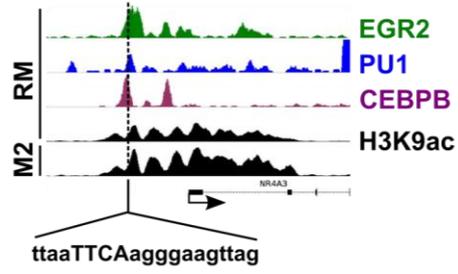


Figure 4

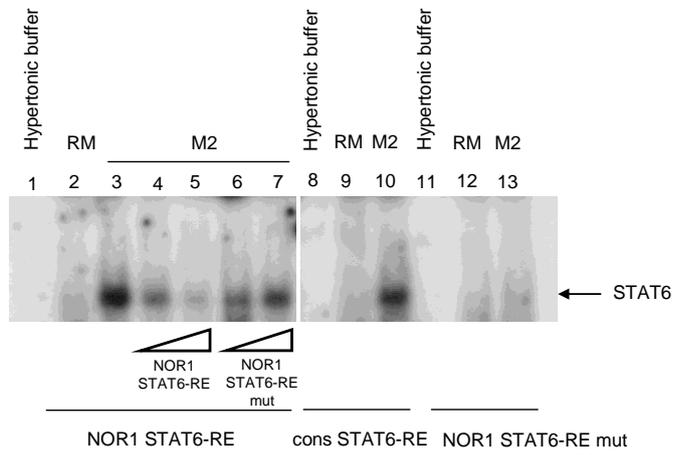


Supplemental figure 1

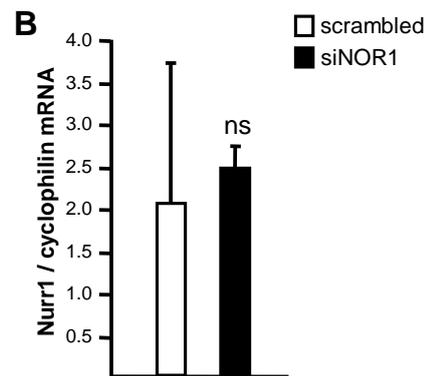
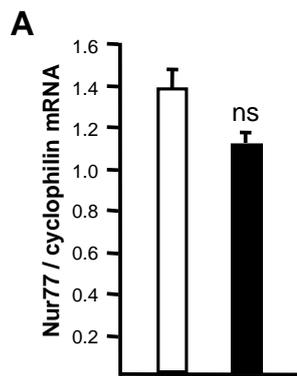
A



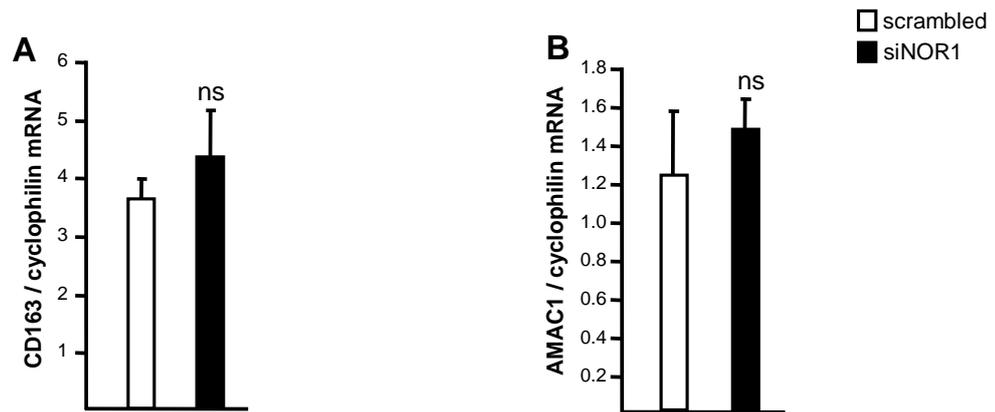
B



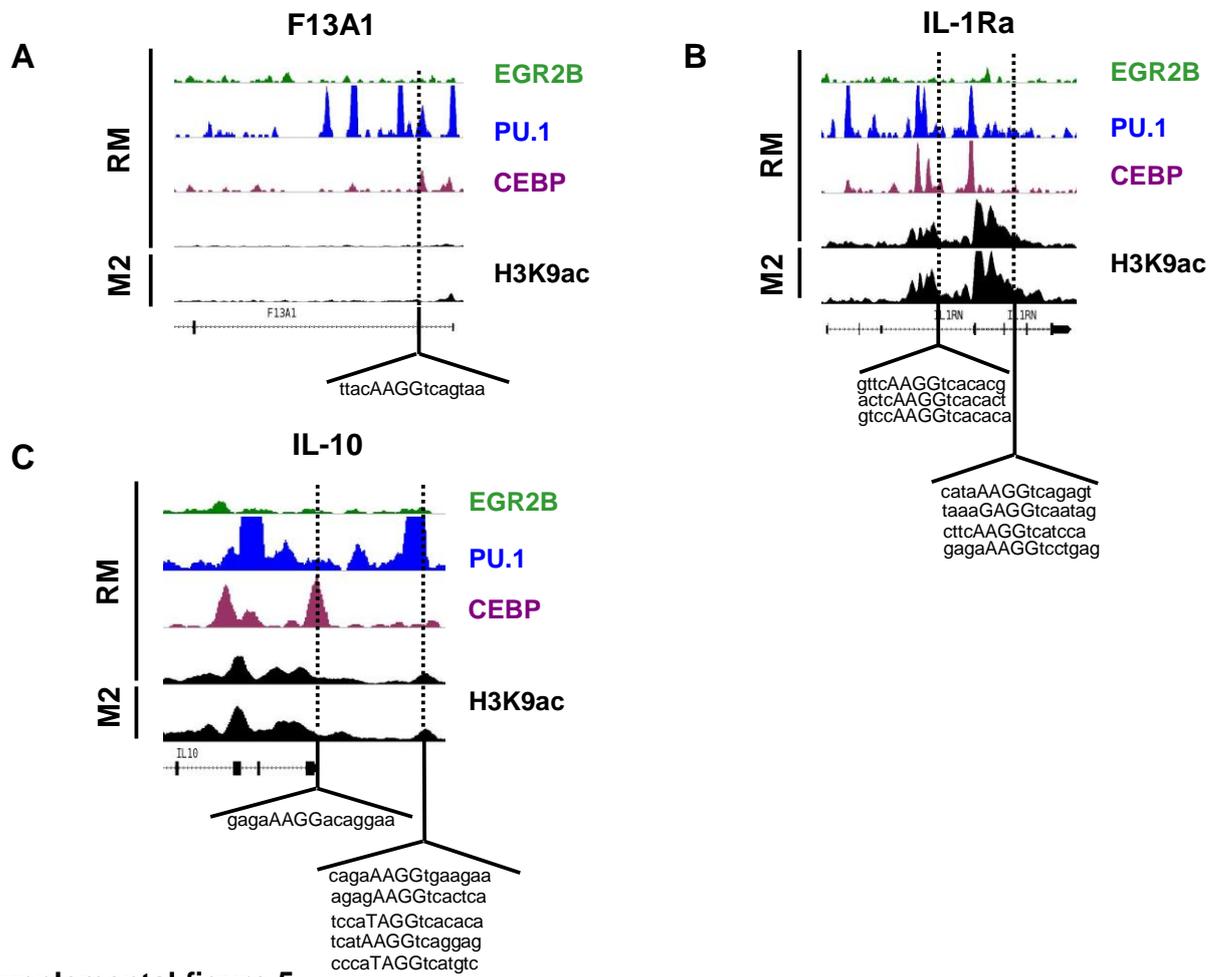
Supplemental figure 2



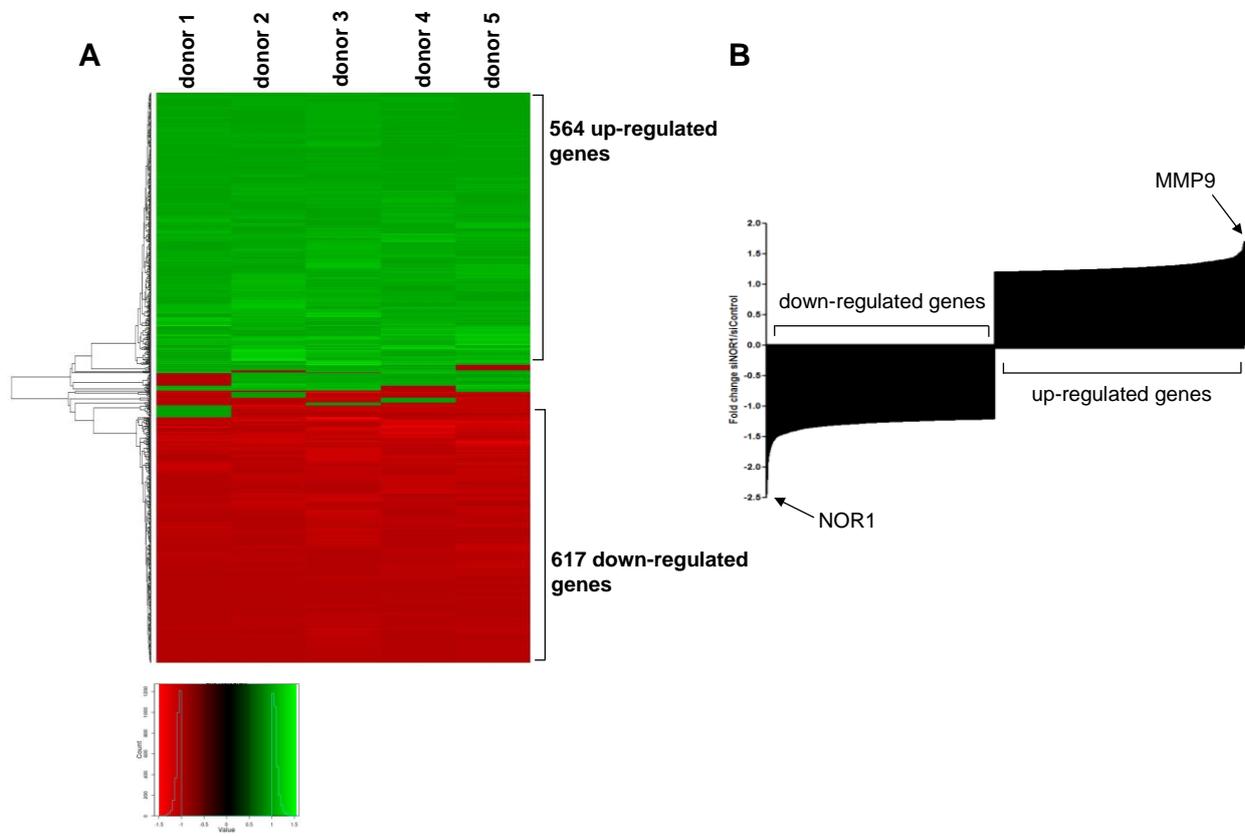
Supplemental figure 3



Supplemental figure 4

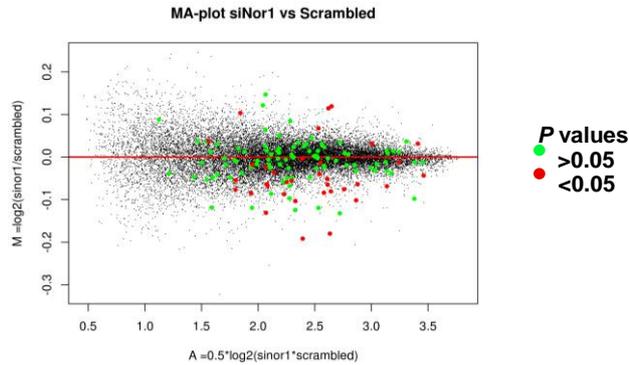


Supplemental figure 5



Supplemental figure 6

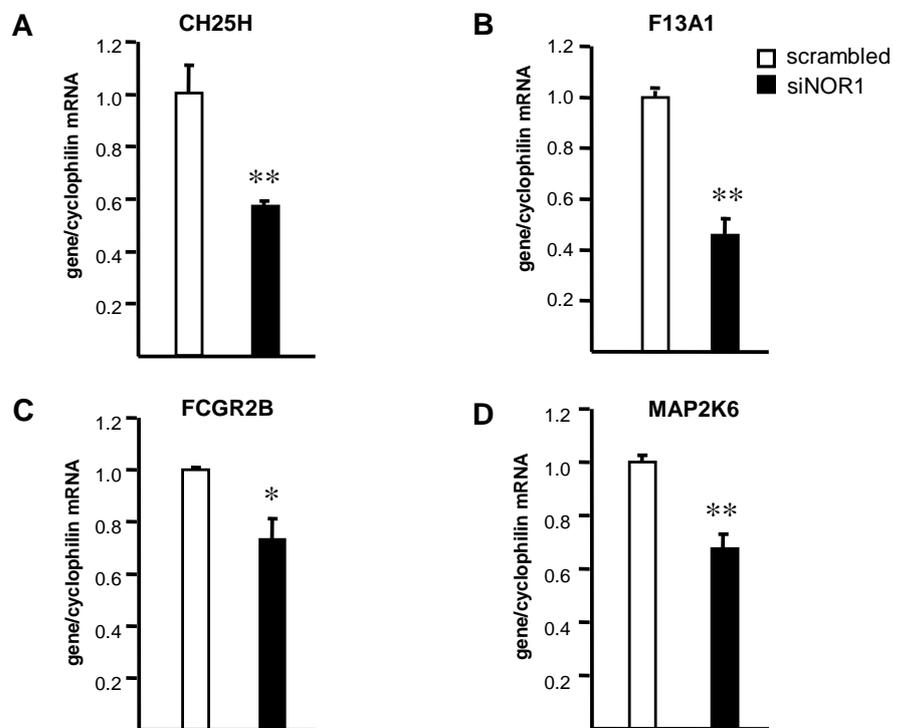
A



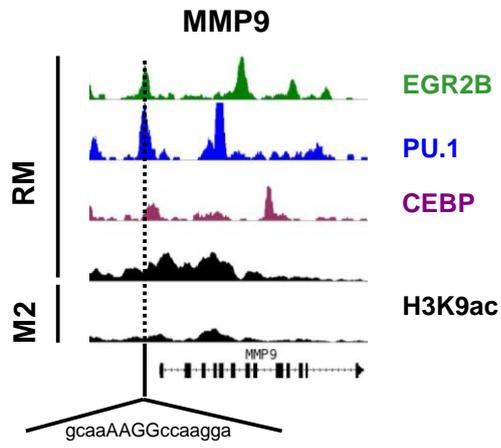
B

Gene symbol	Gene title	M= log2(siNor1/siScrambled)	A=0,5*log2(siNor1*siScrambled)	P-value
NR4A3	nuclear receptor 4 A 3 (NOR1)	-0,192	2,393	0,000
CH25H	cholesterol-25-hydrolase	-0,180	2,633	0,005
GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	-0,131	2,069	0,014
F13A1	coagulation actor 13, A1 polypeptide	-0,103	2,328	0,045
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity Iib, receptor (CD32)	-0,102	2,865	0,003
MAP2K6	mitogen-activated protein kinase kinase 6	-0,087	2,229	0,027
PPP1R14A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	-0,085	1,937	0,013
RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	-0,084	2,581	0,049
FAM20A	family with sequence similarity 20, member A	-0,080	2,642	0,018
HOMER2	homer homolog 2 (Drosophila)	-0,077	1,800	0,021
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	-0,075	2,759	0,003
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	-0,069	3,136	0,027
AKAP5	A kinase (PRKA) anchor protein 5	-0,067	2,084	0,005
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	-0,065	2,614	0,000
ASTN2	astrotactin 2	-0,064	2,077	0,047
CR1	complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group)	-0,064	2,878	0,023
IL17RB	interleukin 17 receptor B	-0,059	2,251	0,039
GPR146	G protein-coupled receptor 146	-0,055	2,296	0,040
STAMBPL1	STAM binding protein-like 1	-0,055	1,803	0,033
TRAF5	TNF receptor-associated factor 5	-0,053	2,297	0,005
DNASE1L3	deoxyribonuclease I-like 3	-0,052	2,611	0,044
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	-0,043	3,461	0,003
NDFIP2	Nedd4 family interacting protein 2	-0,040	2,541	0,019
FAM110B	family with sequence similarity 110, member B	-0,037	2,142	0,016
CHDH	choline dehydrogenase	-0,025	2,069	0,004
CRH	corticotropin releasing hormone	-0,018	1,950	0,040
CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	-0,013	2,551	0,019
FN1	fibronectin 1	-0,012	3,246	0,039
BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-0,003	2,390	0,021

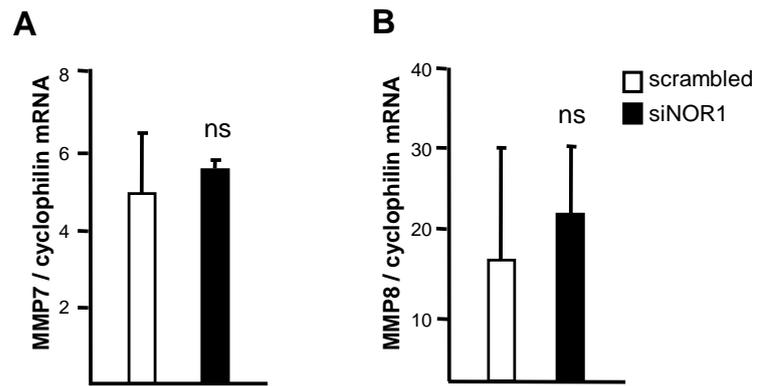
Supplemental Figure 7



Supplemental Figure 8



Supplemental Figure 9



Supplemental figure 10

Supplemental table 1. Primer sequences

AMAC-1	forward	5'-AGC TCT GCT GCC TCG TCT AT-3'
	reverse	5'-CCC ACT TCT TAT TGG GGT CA-3'
MR	forward	5'-CGA GGA AGA GGT TCG GTT CAC C-3'
	reverse	5'-GCA ATC CCG GTT CTC ATG GC-3'
IL-1Ra	forward	5'-TTG AGC CTC ATG CTC TGT TC-3'
	reverse	5'-CAG TGA TGT TAA CTG CCT CCA G-3'
F13A1	forward	5'-GTC TGG GTA CAC CTG GAT GGT C-3'
	reverse	5'-GGC ACA CTT CTT CCC ACT GC -3'
LXR α	forward	5'-AGG GCT GCA AGG GAT TCT TCC-3'
	reverse	5'-TCT GAC AGC ACA CAC TCC TCC C-3'
CD200R1	forward	5'-CAT CGT GGA TAT CAC CTC CAA G-3'
	reverse	5'-CTT GCT TAG TGG CAC AAT CGC-3'
PPAR γ	forward	5'-AGT CCT CAC AGC TGT TTG CCA AGC-3'
	reverse	5'-GAG CGG GTG AAG ACT CAT GTC TGT C-3'
CD163	forward	5'-TTG CCA GCA GT TAA ATG TG-3'
	reverse	5'-AGG ACA GTG TTT GGG ACT GG-3'
IL10	forward	5'-GAG ATG CCT TCA GCA GAG TGA AG-3'
	reverse	5'-ATC TCA GAC AAG GCT TGG CAA C-3'
Ym1/2	forward	5'-GGG CAT ACC TTT ATC CTG AG-3'
	reverse	5'-CCA CTG AAG TCA TCC ATG TC-3'
MMP1	forward	5'-CAT GCG CAC AAA TCC CTT CTA CCC G-3'
	reverse	5'-TCC CTG AAC AGC CCA GTA CT-3'
MMP7	forward	5'-CTT TGC GCG AGG AGC TC-3'
	reverse	5'-AGC ATC TCC TCC GAG ACC TG-3'
MMP8	forward	5'-CCA TTC TTT GGG GCT CGC TCA CTC C-3'
	reverse	5'-GAG TTC CCG GAG TGA GTT GA-3'
MMP9	forward	5'-GAA CCA ATC TCA CCG ACA GG-3'
	reverse	5'-GAG TTC CCG GAG TGA GTT GA-3'
NOR1	forward	5'-GCT GCA AGG GCT TTT TCA AGA G -3'
	reverse	5'-GTA CTG ACA TCG GTT TCG ACG TC-3'
Nurr1	forward	5'-AGC ATA CAG GTC CAA CCC AGT G -3'
	reverse	5'-GGA GAA GGC AGA AAT GTC GAT G-3'
Nur77	forward	5'-AGC ACT GCC AAA CTG GAC TAC TC-3'
	reverse	5'-CGG AGA GCA GGT CGT AGA ACT G-3'
TIMP1	forward	5'-GCT TCT GGC ATC CTG TTG TT-3'
	reverse	5'-CGC TGG TAT AAG GTG GTC TG-3'
cyclophilin	forward	5'-GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C-3'
	reverse	5'-ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C-3'
CH25H	forward	5'-ACCACATCCTGTTCTGCCTGC-3'
	reverse	5'-CGTCATATACTGCGTTGCCAG-3'
FCGR2B	forward	5'-TCATTGTGGCTGTGGTCACTGG-3'
	reverse	5'-GGTTCTTGGTCATCAGGCTCTTCC-3'
MAP2K6	forward	5'-GCAGATCATGGCAGTGAAGCG-3'
	reverse	5'-ACAGTCCACCGTCTCATGG-3'

Supplemental table 1. Genes up-regulated in siNOR1 M2 macrophages compared to scrambled siRNA transfected cells

Gene symbol	Gene title	Fold change	p-value
TPM4	tropomyosin	1.7	1.9*10 ⁻²
CCNA1	cyclin A1	1.67	3.7*10 ⁻²
STX12	syntaxin12	1.6	5*10 ⁻³
ZNF616	zinc finger protein 616	1.56	8*10 ⁻³
ZNF117	zinc finger protein 117	1.55	3*10 ⁻³
CD44	CD44 molecule	1.54	9*10 ⁻³
MMP9	matrix metalloproteinase 9	1.53	5*10 ⁻³
HDAC9	histone deacetylase 9	1.51	4.4*10 ⁻²
PLS3	plastin 3	1.51	1.5*10 ⁻²
ZDHHC16	zinc finger, DHHC-type 16	1.5	5*10 ⁻³

Supplemental table 2. Genes down-regulated in siNOR1 M2 macrophages compared to scrambled siRNA transfected cells

Gene symbol	Gene title	Fold change	p-value
NR4A3	nuclear receptor 4 A 3 (NOR1)	-2.44	2*10 ⁻⁴
CXCL10	CXC motif chemokine 10	-2.2	2.5*10 ⁻²
NEXN	nexilin (F actin-binding protein)	-2.1	4.8*10 ⁻²
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	-1.92	2.8*10 ⁻⁴
TNFS10	TNF ligand superfamily, member 10	-1.82	3*10 ⁻²
WWTR1	ww-domain-containing transcription regulator protein 1	-1.76	2*10 ⁻³
IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	-1.76	8*10 ⁻³
CH25H	cholesterol-25-hydrolase	-1.7	5*10 ⁻³
SLC51B	solute carrier family 51, β subunit	-1.69	1.3*10 ⁻²
SMAD5	smad family member 5	-1.67	3*10 ⁻³

Article 2. TLE1 : un nouvel acteur dans les macrophages alternatifs ?
Caractérisation de l'expression et des fonctions potentielles de TLE1 dans les
macrophages

2.1 INTRODUCTION

Une analyse transcriptomique des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription différemment régulés entre les macrophages non polarisés RM et les macrophages alternatifs M2 humains, réalisée au sein du laboratoire, a mis en évidence que TLE1 ou *Transducin-like enhancer of Split 1* est le troisième parmi les facteurs de transcription les plus exprimés dans les macrophages alternatifs. Cependant jusqu'à aujourd'hui, aucune information n'est disponible dans la littérature concernant son expression dans les macrophages. Pour cette raison il apparaît intéressant d'étudier son profil d'expression et ses fonctions potentielles dans les macrophages humains. Par ailleurs, la protéine TLE1 est connue principalement comme un répresseur de la transcription incapable de se fixer directement à l'ADN et qui agirait donc *via* l'interaction avec d'autres facteurs de transcription liant le double filament (Chen and Courey 2000; Fisher and Caudy 1998). Ainsi nous voudrions chercher à déterminer si TLE1 peut interagir avec d'autres facteurs de transcription au sein des macrophages. Ceci devrait nous permettre d'avancer dans la compréhension du mécanisme d'action potentiel de TLE1.

2.2 MATERIELS ET METHODES

Culture cellulaire

Les monocytes primaires sont isolés à partir de sang de donneurs volontaires sains normolipémiques par centrifugation sur gradient de Ficoll. Les monocytes sont mis en culture pendant 6 jours dans un milieu RPMI 1640 contenant de la gentamycine (40µg/ml) et de la glutamine (2mM) en présence de 10% de sérum humain (Chinetti, et al. 1998). Les macrophages issus de la moelle osseuse (BMDM) de souris sont mis en culture dans un milieu RPMI 1640 contenant de l'HEPES (25mM), de la glutamine (2mM), de la gentamycine (1mM) en présence de 10% de sérum de veau fœtal et du milieu conditionné provenant de la culture de la lignée cellulaire de fibroblasts murins L929 (Cudejko, et al. 2011). En absence de stimulus, ces monocytes se différencient en macrophages non polarisés (ou RM pour *resting macrophages*). En présence d'IL-4, les monocytes s'orientent vers une différenciation

alternative et donnent naissance aux macrophages M2. Enfin, en présence de LPS, les macrophages acquièrent le phénotype pro-inflammatoire M1.

Les macrophages du tissu adipeux (ATM) sont isolés à partir du tissu adipeux viscérale des sujets obèses normoglycémiques qui ont subi une chirurgie bariatrique (collaboration avec le CHRU de Lille). Ces macrophages sont isolés à l'aide des billes magnétiques couplées à l'anticorps anti-CD14 (Mayi, et al. 2012).

Analyse immunohistochimique et capture par microdissection laser (LCM)

Les plaques d'athérosclérose sont prélevées des carotides et sont congelées dans l'azote liquide juste après l'intervention d'endarterectomie (collaboration avec le CHRU de Lille). Pour les analyses histologiques, les cellules endothéliales sont détectées par l'anticorps anti-PECAM1/CD31 qui donne un signal bleu, les cellules musculaires lisses par l'anti- α -actine qui donne un signal gris, et les macrophages par l'anticorps anti-CD68 qui donne un signal rouge. Les sections adjacentes sont marquées à l'aide d'un anticorps anti-MR et anti-TLE1 qui donnent un signal rouge. Les zones enrichies par les macrophages CD68+MR+ et CD68+MR- sont isolées par microdissection laser et l'ARN est extrait (Bories, et al. 2013a).

Expression de l'ARNm et des protéines

Les ARN des macrophages sont extraits et l'expression des gènes d'intérêt est quantifiée par PCR quantitative en temps réel. Les protéines sont également extraites, séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et analysées selon la technique de Western Blot. Après migration, les protéines sont transférées sur membranes de nitrocellulose et révélées avec l'anticorps anti-TLE1.

Analyse par immuno- précipitation de la chromatine (ChIP) et immuno-précipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-Seq)

Les macrophages ont été traités avec 1% de formaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes chromatine/protéines. La chromatine est immunoprécipitée par l'anticorps dirigé contre H3K9ac (Millipore), puis l'ADN immunoprécipité est purifié conformément aux directives du fabricant (Illumina, San Diego, California). Le séquençage à haut débit est réalisé sur l'appareil Genome Analyzer IIx. La détermination des séquences nucléotidiques est effectuée en utilisant le logiciel Casava (Consensus Assessment of Sequence and Variation) et l'identification des pics de fixation de H3K9ac est réalisée à l'aide du programme MACS (Model-based analysis for ChIP-Seq)

(Nielsen, et al. 2008). Les résultats sont analysés en utilisant le « IGV genome browser » (Santa Cruz, University of California).

ARN interférent

Les macrophages sont transfectés par 20µM d'ARN interférent spécifique pour TLE1 humain (siTLE1, Dharmacon), et par 20µM d'ARN interférent contrôle (scrambled, Ambion) et 45µl de Dharmafect 4 (agent transfectant, Dharmacon) dans du milieu de culture sans sérum pendant 16 heures. Après changement du milieu, les cellules sont cultivées pendant 24-48 heures supplémentaires ou stimulées avec du LPS.

2.3 RESULTATS

L'expression de TLE1 est induite dans les macrophages alternatifs M2 *in vitro*

Afin de confirmer les résultats du screening des facteurs de transcription, nous avons tout d'abord vérifié si l'expression de TLE1 était induite dans les macrophages alternatifs M2 par rapport aux macrophages RM. Nous retrouvons une forte induction de TLE1 dans les macrophages alternatifs M2 au niveau protéique et au niveau génique (Figure 16A et B). De plus, les résultats obtenus par ChIPseq de H3K9ac (séquençage haut débit des fragments de chromatine immunoprécipitée par un anticorps capable de reconnaître la forme acétylée de la lysine 9 de l'histone 3 du gène TLE1) mettent en évidence un enrichissement du signal beaucoup plus important dans les macrophages M2, comparativement aux macrophages RM (Figure 16C). Ceci suggère que les promoteurs et les *enhancers* du gène TLE1 sont potentiellement plus actifs dans les macrophages alternatifs humains. D'ailleurs, nous avons démontré que la régulation de l'expression de TLE1 par l'IL-4 est observée aussi chez la souris. En effet, les macrophages issus de la moelle osseuse de souris contrôle (BMDM) traités pendant 6 jours avec l'IL-4 ont un niveau d'expression de TLE1 plus important que les BMDM non polarisés (Figure 16D).

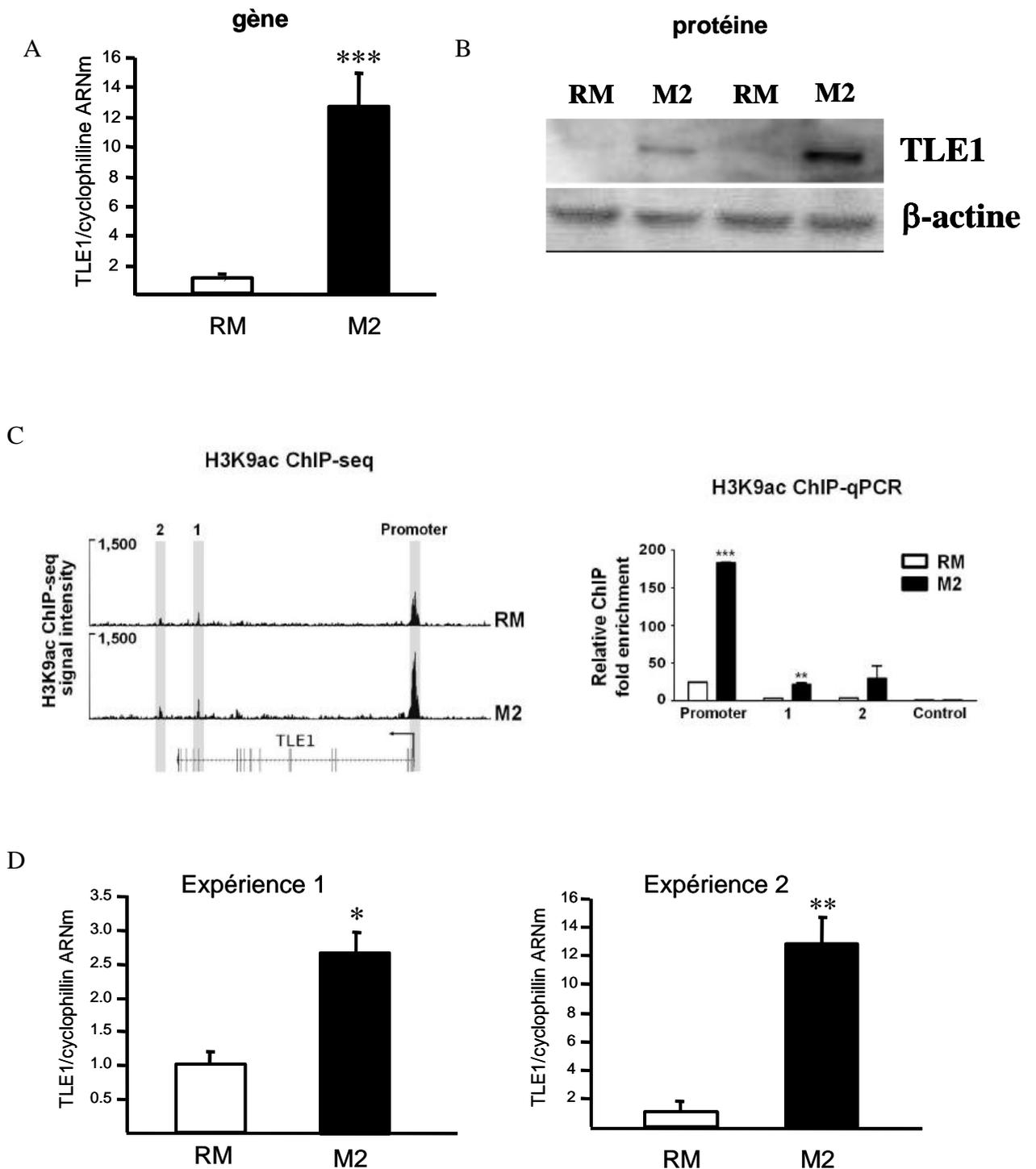


Figure 16. L'expression de TLE1 est induite dans les macrophages alternatifs M2 *in vitro*. **A et B** Analyse de l'expression de l'ARNm (**A**) et de la protéine (**B**) TLE1 dans les macrophages RM et M2 humains. **C**, Analyse de l'activité potentielle du promoteur et des *enhancers* 1 et 2 de TLE1 dans les macrophages RM et M2 humains. **D**, Analyse de l'expression de l'ARNm de TLE1 dans les BMDM polarisés (M2) ou pas (RM) pendant 6 jours avec l'IL-4.

TLE1 est exprimé dans les macrophages alternatifs M2 *in vivo*

Compte tenu de la forte expression de TLE1 dans les macrophages alternatifs *in vitro*, nous avons analysé son expression *in vivo* au sein de la plaque d'athérosclérose humaine. Les expériences d'immunohistochimie montrent que l'expression de TLE1 co-localise fortement avec la sous-population de macrophages alternatifs CD68+MR+ (Figure 17A). Les analyses géniques menées sur ces zones isolées par microdissection laser ont confirmé une forte expression de TLE1 dans les zones enrichies en macrophages alternatifs M2 CD68+/MR+ (Figure 17B).

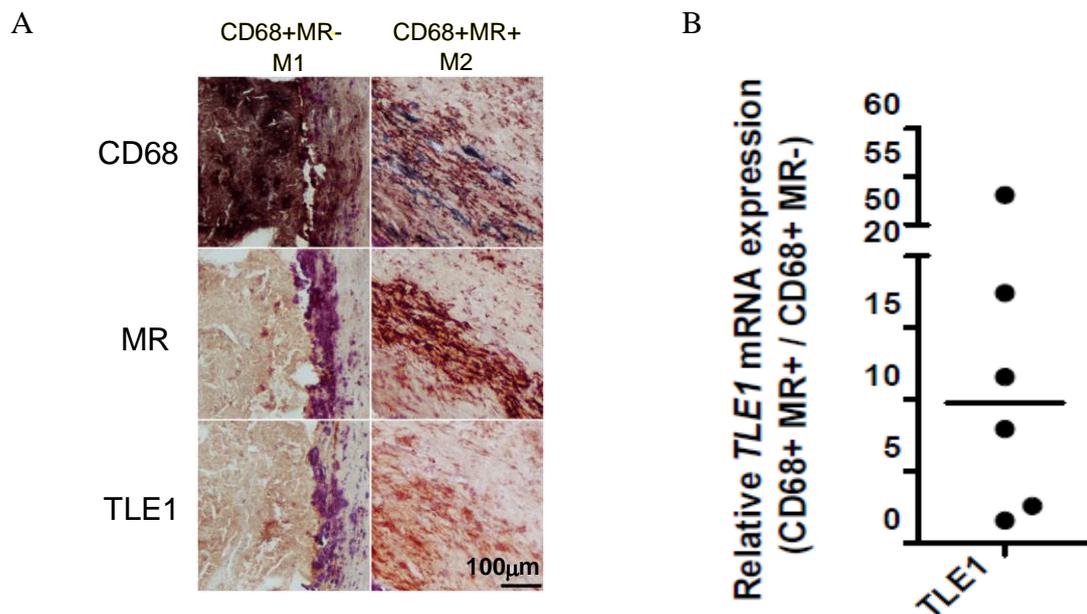


Figure 17. **TLE1 est exprimé dans les macrophages alternatifs M2 *in vivo***. **A et B.** **A**, Immunomarquage de CD68, MR, TLE1 dans la plaque d'athérosclérose humaine. **B**, Analyse de l'expression génique de TLE1 dans les zones de plaques d'athérosclérose humaine isolées par microdissection laser.

L'expression de TLE1 est régulée par des stimuli pro- et anti-inflammatoires.

L'expression de TLE1 est dépendante de la stimulation avec l'IL-4 ; en fait, son expression est déjà induite après 24h de stimulation avec l'IL-4 (Figure 18A). De plus, l'expression de ce facteur est aussi induite dans les macrophages pro-inflammatoires M1 en réponse à une stimulation avec le LPS (Figure 18B).

Par la suite, nous avons démontré que l'expression de TLE1 ne se limite pas seulement aux macrophages des plaques d'athérosclérose mais TLE1 est aussi présent dans les macrophages qui infiltrent le tissu adipeux (ATM) chez les patients obèses et qui présentent un phénotype mixte M1/M2 (Zeyda, et al. 2007). Nos résultats montrent ainsi que les ATM expriment plus

de TLE1 que les macrophages RM différenciés à partir des monocytes circulants issus de mêmes sujets (Figure 18C).

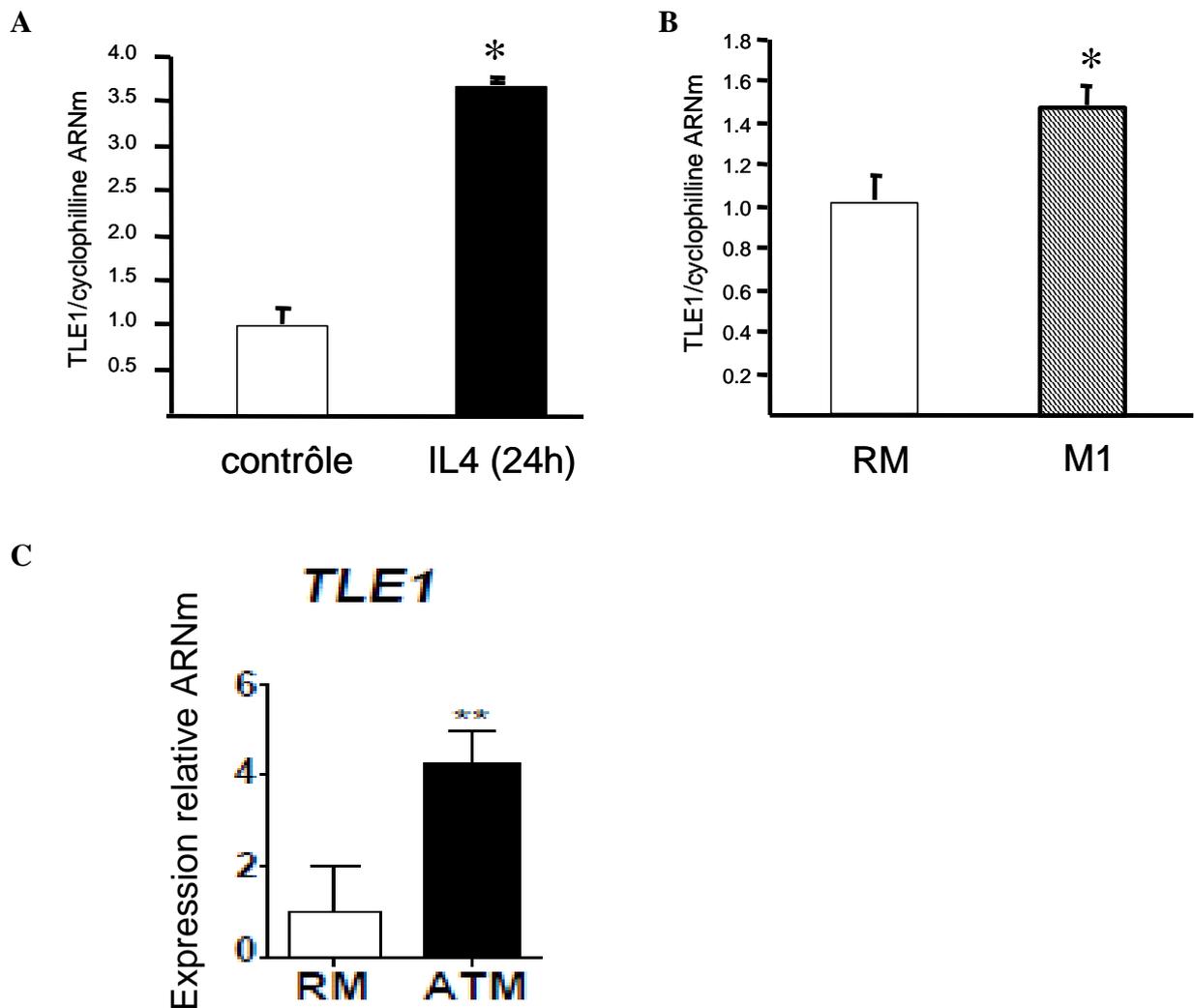


Figure 18. L'expression de TLE1 réponds aux stimuli pro- et anti-inflammatoires. **A, B et C.** **A**, Analyse de l'expression de l'ARNm de TLE1 dans les macrophages RM humains non traités et stimulés pendant 24 h avec l'IL-4. **B**, Analyse de l'expression de l'ARNm de TLE1 dans les macrophages RM et M1. **C**, Analyse de l'expression de l'ARNm de TLE1 dans les macrophages vasculaires non polarisés RM et dans les macrophages ATM issus des mêmes sujets obèses.

Rôle potentiel de TLE1 dans la polarisation alternative des macrophages

Compte tenu de la forte expression de TLE1 dans les macrophages M2, nous avons voulu déterminer si cette protéine pouvait avoir un rôle dans la polarisation alternative des macrophages. Pour cela, des expériences de réduction de l'expression de TLE1 par la technique de siRNA dans les macrophages M2 ont été réalisées. Nos résultats montrent que suite au *silencing* de TLE1, l'expression de certains gènes connus pour être des marqueurs

M2, tels que l'IL-10 et l'IL-1Ra diminue (Figure 19). Ces données relatives aux taux d'ARN messager nécessitent d'être complétées par des analyses d'expression protéique.

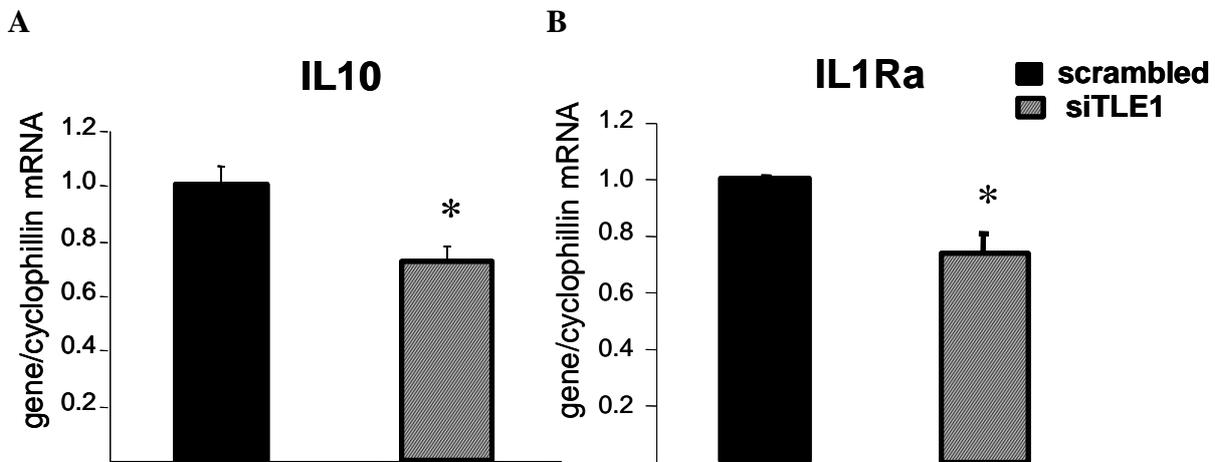


Figure 19. **TLE1 augmente l'expression des marqueurs de la polarisation alternative.** **A et B,** Analyse de l'expression de l'mRNA de IL10 (**A**) et IL1Ra (**B**) dans les macrophages M2 humains après réduction de l'expression de TLE1 par la technique de siRNA.

TLE1 présent des propriétés anti-inflammatoires

Des données de la littérature montrent que TLE1 est capable d'interagir physiquement avec p65, ce qui conduit à la répression de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B sur ses gènes cibles (Tetsuka, et al. 2000). D'autre part, il est bien connu qu'un stimulus inflammatoire comme le LPS induit l'activité de fixation de NF- κ B sur les promoteurs des ses gènes cibles. A partir de ces données, nous avons mis en place des expériences de *silencing* de TLE1 dans les deux types de macrophages humains RM et M2 suivi par une stimulation avec le LPS. Nos résultats montrent que l'expression génique de certaines molécules pro-inflammatoires comme l'*interleukin-6* (IL6), le *tumor necrosis factor alfa* (TNF α) et le *chemokine C-C motif ligand 3* (CCL3) augmente (Figure 20 et Figure 21) après transfection avec le siTLE1. Ces résultats, qui doivent être validés au niveau protéique, semblent suggérer un rôle anti-inflammatoire de TLE1 dans les macrophages humains.

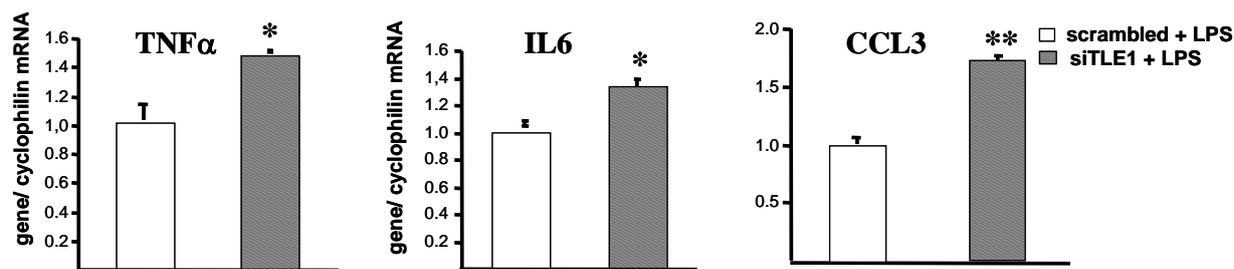


Figure 20. **TLE1 présente des propriétés anti-inflammatoires dans les macrophages RM.** Analyse de l'expression de l'ARNm de TNF α , IL6 et CCL3 dans les macrophages RM après réduction de l'expression de TLE1 par la technique de siRNA suivie par 4h de stimulation avec LPS.

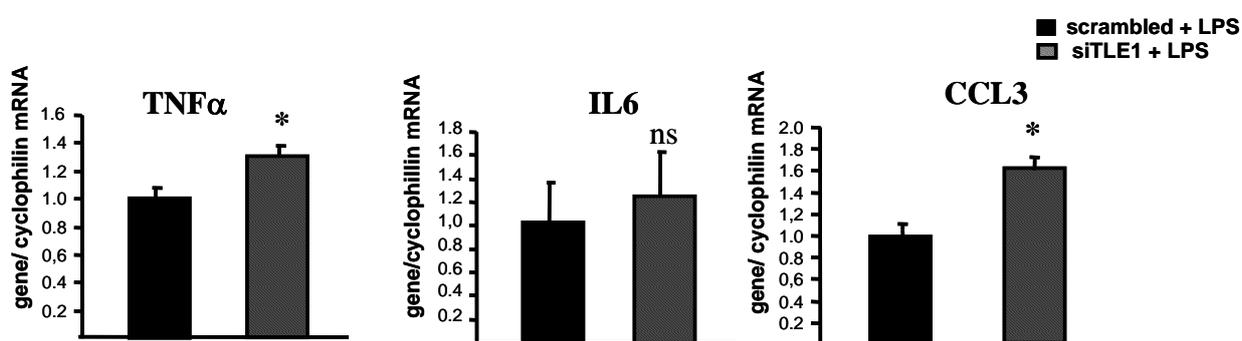


Figure 21. **TLE1 présente des propriétés anti-inflammatoires dans les macrophages M2.** Analyse de l'expression de l'ARNm de TNF α , IL6 et CCL3 dans les macrophages M2 après réduction de l'expression de TLE1 par la technique de siRNA suivie par 4h de stimulation avec LPS.

Variation de l'expression de TLE1 dans différents contextes métaboliques.

Des travaux publiés récemment ont mis en évidence un lien potentiel entre l'expression de TLE1 et le diabète de type 2 (T2D), en montrant la présence d'un SNP (*single nucleotide polymorphism*) de susceptibilité au T2D dans le locus de TLE1 (Harder, et al. 2013; Huopio, et al. 2013). De plus, Metzger et collègues ont suggéré que TLE1 pourrait jouer un rôle dans la transformation des cellules alpha en cellules beta dans le pancréas humain (Metzger, et al. 2014). Tout cela nous a amené à étudier si l'expression de TLE1 était affectée par le diabète et/ou l'obésité chez l'homme. Nos résultats montrent que l'expression de TLE1 est diminuée dans les cellules mononuclées sanguines circulantes (PBMC) de patients obèses diabétiques par rapport aux sujets obèses normoglycémiques (Figure 22A). Lorsque ces PBMC sont mis en culture et différenciés en macrophages en présence ou non d'IL-4, l'induction de TLE1 dans les macrophages M2 par rapport aux macrophages RM est maintenue; cependant, aucune variation d'expression est observée parmi les différents groupes de patients (Figure 22B). Il

s'agit cependant de résultats préliminaires et qui, à l'état actuel de notre connaissance, restent difficile à expliquer. Toutefois, dans la section « Perspectives » de ce manuscrit, des analyses supplémentaires seront proposées pour essayer d'en clarifier la signification.

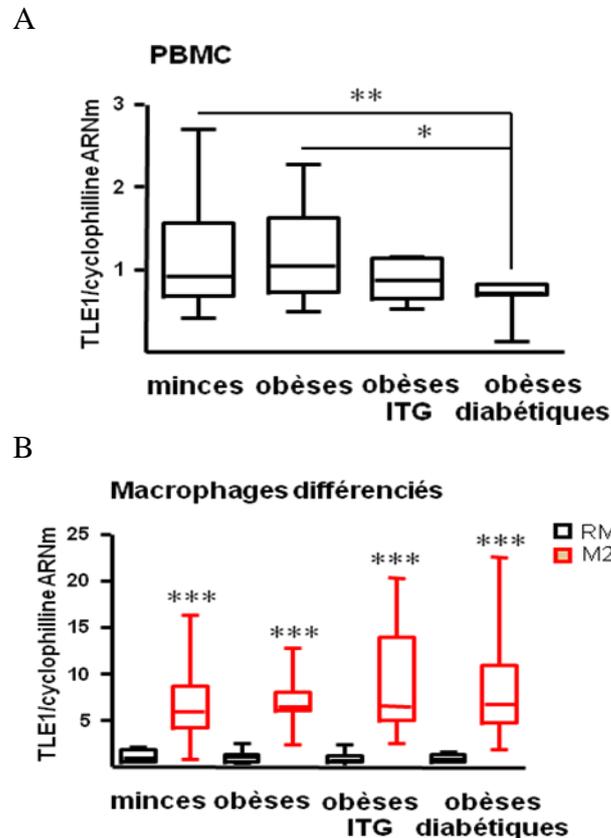


Figure 22. **TLE1 et le diabète de type 2, A et B.** Analyse de l'expression de l'ARNm de TLE1 dans les PBMC (A) et dans les macrophages RM et M2 (B) de patients minces normoglycémiques, obèses, obèses avec intolérance au glucose et obèses diabétiques.

2.4 CONCLUSION

TLE1 est connu principalement pour ses fonctions dans le développement du système nerveux. En effet, il est décrit comme étant un acteur clef dans la survie des neurones. De plus, il est détecté dans plusieurs types de tumeurs et il peut être considéré comme un marqueur de certains cancers. Son expression a été démontrée dans différents tissus. Une analyse des facteurs de transcription différemment exprimés entre les macrophages RM et les macrophages M2 humains a mis en évidence l'expression de TLE1 pour la toute première fois dans les macrophages humains. Par ailleurs, TLE1 est exprimé plus fortement dans les macrophages alternatifs. De ce fait, il est apparu intéressant de caractériser son expression et les fonctions au sein des macrophages humains.

Nos résultats confirment l'induction de l'expression de TLE1 dans les macrophages alternatifs humains, ainsi que murins, par rapport aux macrophages non polarisés. Par ailleurs, nous montrons que TLE1 est présent au sein de la plaque d'athérosclérose humaine et que son expression est plus importante dans les zones enrichies en macrophages CD68+MR+ par rapport aux zones enrichies en macrophages CD68+MR-. En outre nous montrons que l'expression de TLE1 répond aux stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS. Cependant, cette induction est moins importante que celle observée dans les macrophages alternatifs M2. Nous avons mis en évidence que la diminution de l'expression de TLE1 dans les macrophages alternatifs induit une diminution de l'expression génique de certains marqueurs de la polarisation alternative. De plus, cette même diminution de l'expression de TLE1 provoque une réponse accrue des macrophages à la stimulation par le LPS. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle potentiellement anti-inflammatoire de TLE1 dans les macrophages. Enfin, les résultats concernant son profil d'expression ARN messager dans les différents groupes de patients minces, obèses et diabétiques suggèrent que l'expression de TLE1 pourrait être influencée par le taux de glucose et, en particulier, par l'état métabolique et glycémique de l'individu donneur.

2.5 PERSPECTIVES

Caractérisation de l'expression de TLE1 dans les sous-populations de macrophages CD68+MR+ de la plaque d'athérosclérose

Afin de compléter la caractérisation de l'expression de TLE1 au sein de la plaque d'athérosclérose, une approche par microdissection laser sera utilisée pour isoler les différentes sous-populations de macrophages alternatifs que nous avons identifiées au laboratoire. Ces cellules seront isolées à partir de plaques carotidiennes humaines obtenues par endarteriectomie grâce à une collaboration avec l'équipe du Prof. B. Jude (CHRU de Lille). A partir d'un fragment de plaque carotidienne, des coupes histologiques seront réalisées pour détecter les macrophages M2 grâce à un double immunomarquage avec un anticorps anti-CD68 (marqueur de surface des macrophages) et un anticorps anti-MR (récepteur au mannose, spécifique des macrophages M2). Les cellules positives dans les différentes zones de la lésion, à savoir près des dépôts lipidiques, dans des zones calcifiées ou près des neo-vaisseaux, seront isolées par microdissection laser. Les ARN de ces sous-populations des macrophages seront extraits et leur profil génique analysé par PCR quantitative.

Etude des fonctions de TLE1 dans les macrophages alternatifs humains

Afin de déterminer si TLE1 joue un rôle dans la réponse inflammatoire des macrophages, nous avons mis en place des expériences de réduction de l'expression de TLE1 par la technique de siRNA, suivies par une stimulation avec le LPS et nous avons observé une diminution de l'expression génique de certaines molécules pro-inflammatoires telles que l'IL6, le TNF α et le CCL3. Nous prévoyons de confirmer ces résultats en mesurant l'expression de ces cytokines au niveau protéique par ELISA.

D'après nos résultats, TLE1 est induit dans les macrophages alternatifs et nous avons donc utilisé l'approche de *silencing* de TLE1 pour identifier les gènes connus pour être des marqueurs de la polarisation alternative dont l'expression est régulée par la suppression de l'expression de TLE1. Nous avons identifié deux gènes comme étant modulés par TLE1 : IL-10 et IL-1Ra. Ces données obtenues seront validées tout d'abord par Q-PCR puis par des analyses protéiques grâce à la technique de western blot.

Caractérisation de l'expression de TLE1 dans des contextes pathologiques, tels que le diabète et l'obésité

Pour essayer de clarifier le profil d'expression de TLE1 dans les patients obèses diabétiques, nous avons la possibilité d'avoir accès aux données biologiques et cliniques de ces sujets. Ainsi nous procéderons à une re-analyse des résultats de TLE1 en prenant en considération d'autres paramètres tels que l'âge des individus, leur état inflammatoire, les traitements pharmacologiques (anti-diabétiques ou anti-inflammatoires par exemple). De plus, grâce à la collaboration avec le CHRU de Lille nous augmenterons le nombre de ces échantillons afin de confirmer les résultats déjà obtenus. Ces échantillons sont issus des patients recrutés dans le cadre du projet ABOS (Atlas Biologique de l'Obésité Sévère), une étude longitudinale débutée en 2006 au CHRU de Lille pour explorer les conséquences métaboliques de la chirurgie bariatrique. Le recrutement de ces patients est fait d'une façon régulière ce qui nous permettra de récolter suffisamment d'échantillons dans un délai de quelques mois.

Etude de l'expression et des fonctions de TLE1 dans le métabolisme du glucose

En parallèle, nous procéderons à la mise en place d'expériences de dose-réponse au glucose pendant les 6 jours de différenciation/polarisation des macrophages et/ou sur macrophages déjà différenciés dans le but de déterminer si le profil d'expression de TLE1 change en fonction de la concentration en glucose. Par la suite, nous utiliserons l'approche de *silencing* de TLE1 dans des conditions expérimentales de culture en présence de différentes

concentrations de glucose (haut et bas glucose) afin d'identifier si les gènes impliqués dans le transport du glucose (tels que GLUT1) et sa voie de signalisation sont régulés par la suppression de TLE1. L'expression génique sera mesurée par Q-PCR suivie par des analyses protéiques (western blot et cytométrie en flux). Sur la base des résultats obtenus, des analyses fonctionnelles appropriées pourront également être mises en place pour étudier l'impact de la diminution de l'expression de TLE1 sur les fonctions des macrophages (ex : uptake du glucose).

Identification du mécanisme d'action

Compte tenu du fait que TLE1 est un répresseur de la transcription incapable de se fixer directement à l'ADN, nous souhaitons identifier son/ses partenaires d'interaction dans les macrophages alternatifs humains. Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons une approche d'immunoprécipitation de la chromatine par un anticorps spécifique anti- TLE1 suivie par la technique de spectrométrie de masse. Cette approche technologique sera réalisée grâce à la forte interaction avec l'équipe 4 de notre Unité ainsi que grâce à la collaboration établie avec le Dr. J. Carroll de l'Université de Cambridge. Les échantillons issus des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine seront aussi soumis à séquençage à haut débit de l'ADN dans le but d'identifier les potentiels gènes cibles de TLE1.

DISCUSSION

ET

CONCLUSION

Au cours de la première partie de ma thèse je me suis intéressée à l'étude du rôle du récepteur nucléaire orphelin NOR1 dans les macrophages alternatifs puis dans la deuxième partie de ma thèse j'ai caractérisé l'expression et le rôle potentiel du répresseur TLE1, un nouveau facteur de transcription étudié dans le contexte macrophagique.

Dans cette partie, je discuterai les résultats obtenus afin de mettre en évidence leur apport dans la compréhension des phénotypes fonctionnels des macrophages humains.

NOR1 et la polarisation alternative des macrophages humains.

Notre première étude a démontré pour la première fois une forte expression du facteur de transcription NOR1 dans les macrophages alternatifs humains et que cette expression est directement dépendante de la stimulation avec l'IL-4. Cette régulation s'explique par le fait que NOR1 semble être sous le contrôle direct de STAT6. Ce facteur de transcription, connu pour être activé par la cytokine IL-4, joue un rôle clef dans les macrophages alternatifs compte tenu du fait qu'il est responsable de la transcription de gènes associés à ce phénotype, tels que Arg1, FIZZ1, Ym1 et MR (Goenka and Kaplan 2011; Sica and Bronte 2007).

Nos résultats suggèrent que NOR1 est un modulateur du phénotype des macrophages M2 humains étant capable d'induire l'expression d'une série de gènes connus pour être des marqueurs de la polarisation alternative. Certains de ces gènes semblent être potentiellement directement régulés par NOR1. En effet, des éléments de réponses à NOR1 (NBRE) ont été retrouvés dans les promoteurs de IL-10, IL-1Ra et F13A1. Ces données viennent s'ajouter aux données limitées présentes dans la littérature concernant les gènes cibles de ce récepteur nucléaire. Au jour d'aujourd'hui, seulement deux gènes ont été décrits comme étant directement régulés par NOR1. Il s'agit de la Cyclin D1 décrite pour être une cible directe de NOR1 dans les cellules musculaires lisses humaines et murines (Nomiya, et al. 2009) ainsi que dans les hépatocytes murins (Vacca, et al. 2013), et de VCAM-1 qui est décrit pour être sous la régulation directe de NOR1 dans les cellules endothéliales (Zhao, et al. 2010). D'ailleurs, nos résultats concernant la régulation de l'expression des marqueurs de la polarisation alternative sont en cohérence avec les données publiées par Chao et collègues (Chao, et al. 2013) qui montrent que les macrophages issus de la moelle osseuse des souris LDLR^{-/-} NOR1^{-/-} présentent une baisse d'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Par la suite, nous avons réalisé une analyse bio-informatique en croisant les données des puces à ADN qui comparent les transcrits des macrophages RM aux macrophages M2 avec les données des puces qui comparent les transcrits des macrophages M2 transfectés avec le

siRNA scrambled aux macrophages transfectés avec le siNOR1. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence que les gènes très fortement exprimés dans les macrophages alternatifs sont globalement diminués par le siNOR1.

Cette étude nous a permis de démontrer un rôle de NOR1 dans la régulation du phénotype alternatif des macrophages humains. En fait, il serait capable de promouvoir le phénotype M2 en augmentant l'expression des marqueurs de la polarisation alternative.

NOR1 et la balance entre les phénotypes de macrophages M2-M1 : implication dans la stabilité de la plaque d'athérosclérose

Nous avons démontré que NOR1 diminue l'expression et l'activité de la MMP9, une collagénase produite par les macrophages et les neutrophiles – granulocytes et impliquée dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire et des interactions intracellulaires, ainsi que dans l'instabilité de la plaque d'athérosclérose. Nous avons démontré que la régulation de NOR1 se limite à ce membre de la famille des MMPs : l'expression des autres membres tels que MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 et MMP8 n'est pas affectée. Nos résultats sont en partie confortés par des données de la littérature. Un travail réalisé par Bonta et collègues (Bonta, et al. 2010) utilisant un modèle expérimental de ligation de l'artère carotidienne chez la souris, a démontré que Nur77, autre membre de la famille des NR4A, régule de façon négative l'expression génique de la MMP9 et de la MMP1 et l'expression protéique de la MMP2 au sein des cellules musculaires lisses.

La comparaison des données de puce à ADN des macrophages transfectés avec le siRNA scrambled et le siNOR1 a permis de mettre en évidence le gène TIMP3 ou *tissue inhibitor of metalloproteinase 3* comme étant positivement régulé par NOR1. Il s'agit d'une protéine sécrétée qui appartient à la famille des TIMP capable de se lier à la matrice extra-cellulaire et d'inhiber ainsi les métalloprotéinases. L'expression de cette protéine au sein de la lésion athérosclérotique est associée à une augmentation du contenu en collagène et par conséquent à une stabilité accrue de la plaque d'athérosclérose (Casagrande, et al. 2012). D'ailleurs, la MMP9 figure parmi les métalloprotéinases qui sont inhibés par TIMP3 ce qui renforce le concept que cet inhibiteur a un rôle stabilisateur de la plaque.

Enfin, il faut porter l'attention sur le fait que TIMP3, régulé positivement par NOR1, est fortement exprimé dans les macrophages alternatifs alors que la MMP9, régulée négativement par NOR1, est plutôt un marqueur pro-inflammatoire. Ces observations sont en faveur de l'hypothèse que NOR1 module le phénotype des macrophages en promouvant un phénotype qui favoriserait la stabilisation de la plaque.

Les données récentes de la littérature montrent que, plus que le nombre absolu de macrophages, c'est la proportion relative entre macrophages M1 et macrophages M2 qui a des conséquences sur l'instabilité de la plaque d'athérocclérose (Cho, et al. 2013; Shaikh, et al. 2012). Stoger et collègues ont mis en évidence une accumulation de macrophages M1 dans la région d'épaulement de la lésion qui est une zone sensible à la rupture (Barlis, et al. 2008; Stoger, et al. 2012) ainsi qu'un nombre plus élevé de ces macrophages, par rapport aux macrophages M2, dans les plaques instables (Figure 23). Par conséquence, les effets pro-inflammatoires des macrophages M1 dans la chape fibreuse sont contrebalancés par les effets bénéfiques pro-fibrotique et stabilisateur de la plaque des macrophages M2 (Lee, et al. 2001). Cependant, toutes ces données sont principalement le résultat d'études de corrélation, sans démonstration expérimentale scientifique.

A partir de ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que NOR1 en promouvant le phénotype M2 et en diminuant le phénotype M1 des macrophages, joue un rôle dans la vulnérabilité de la plaque.

Ainsi le développement futur de modulateurs pharmacologiques de l'activité de NOR1, pourrait offrir des perspectives intéressantes de traitement de l'athérosclérose en jouant sur la balance entre macrophages M2 et M1 et donc sur la stabilité de la plaque d'athérome.

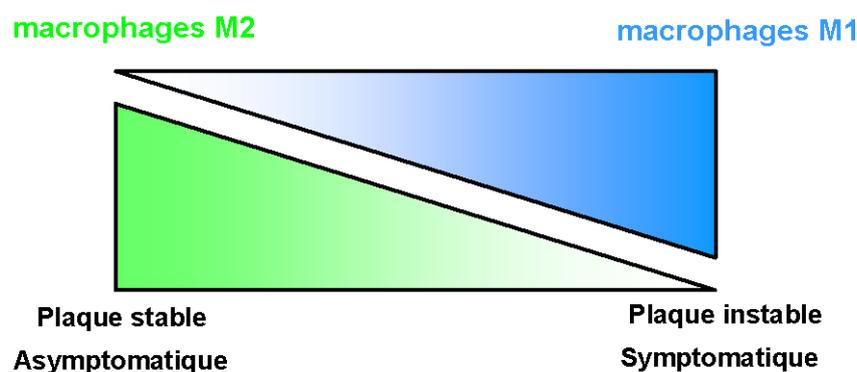


Figure 23. La balance entre les phénotypes M1 et M2 des macrophages et l'implication potentielle dans la stabilité de la plaque d'athérosclérose

Caractérisation de l'expression et du rôle de TLE1 dans les macrophages alternatifs

Cette étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois la présence du facteur TLE1 dans les macrophages humains. Nos résultats montrent que TLE1 est exprimé de façon plus importante par les macrophages M2 par rapport aux macrophages non polarisés RM. L'expression accrue de TLE1 dans les macrophages alternatifs humains polarisés en présence de l'IL4 est aussi observée dans les macrophages de souris. D'ailleurs, nous montrons que ce facteur est exprimé aussi au sein de la plaque d'athérosclérose où son signal colocalise avec celui du marqueur des macrophages CD68 et celui de la polarisation alternative MR. Ainsi nous mettons en évidence que TLE1 est plus exprimé dans les zones enrichies en macrophages CD68+MR+ par rapport aux zones enrichies par les macrophages CD68+MR-. Compte tenu du fait que la régulation de TLE1 est vérifiée aussi chez la souris, nous pouvons envisager de mesurer l'expression de TLE1 au sein de la lésion d'athérosclérose murine. De plus, nous pourrions imaginer de déterminer l'impact de TLE1 sur le développement de la lésion athéromateuse en utilisant des modèles de souris déletées pour les allèles codant pour TLE1 au niveau des cellules hématopoïétiques. Cependant, les études réalisées chez la souris homozygote knockout pour TLE 1 (TLE1^{-/-}) et pour les autres membres de la famille Groucho revelent que ces souris naissent viables mais meurent après un mois de vie seulement (Metzger, et al. 2014; Muhr, et al. 2001; Yao, et al. 2000), (Ramasamy S, poster 1197 presented at 54th ASH Annual Meeting and Exposition 2012). Pour cette raison, dans le choix du modèle murin, il semble être plus opportun de s'orienter vers des souris hétérozygotes TLE1^{+/-}. Par la suite, nous avons démontré un rôle potentiellement anti-inflammatoire de TLE1 au sein des macrophages ; en fait, nous montrons qu'il est capable de diminuer l'expression de certains marqueurs de la polarisation alternative ainsi que de réduire l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation avec le LPS. Cette propriété anti-inflammatoire est en accord avec les données de la littérature qui montrent que les macrophages péritonéaux des souris konckout pour TLE1 produisent plus d'IL6 et TNF α , en réponse à une stimulation avec un ligand de TLR, que les macrophages péritonéaux des souris sauvages (Ramasamy S, poster 1197 presented at 54th ASH Annual Meeting and Exposition 2012).

Par ailleurs, nos résultats montrent que l'expression de TLE1 pourrait être affectée par les taux de glucose. En fait, le niveau d'expression de l'ARN messenger de TLE1 dans les cellules mononuclées sanguines circulantes (PBMC) de différents groupes de patients minces, obèses et diabétiques varie et en particulier, il est plus faible dans les patients obèses diabétiques par rapport aux sujets obèses ou minces normoglycémiques. Cependant, lorsque les PBMC sont

différenciés *in vitro*, l'induction de TLE1 dans les macrophages M2 par rapport aux macrophages RM est maintenue et aucune différence d'expression n'est observée dans les différents groupes. A ce stade, ces résultats restent difficiles à interpréter, leur analyse nécessiterait la prise en compte d'autres paramètres biologiques de ces patients. Grâce à la fructueuse collaboration avec le CHRU de Lille, nous avons la possibilité d'avoir accès aux données biologiques et cliniques de ces patients telles que l'âge, le sexe, la glycémie, l'insulinémie, le traitement pharmacologique anti-diabète ou anti-inflammatoire. En parallèle, afin d'éviter une perte de significativité statistique due à la réduction du nombre d'échantillons par groupe lors de cette re-analyse, nous projetons d'augmenter le nombre d'individus inclus dans cette étude.

Tous ces résultats sont passionnants, certes il s'agit parfois de résultats préliminaires à valider mais plusieurs pistes prometteuses ont été abordées. Compte tenu de la nouveauté du sujet, il semble intéressant de poursuivre cette étude à fin d'apporter de nouveaux éléments qui permettront d'avoir une meilleure compréhension du rôle de TLE1 dans les macrophages alternatifs.

CONCLUSION

Le travail réalisé au cours de ces années de thèse nous ont permis d'identifier deux nouveaux facteurs impliqués dans la modulation du phénotype des macrophages. Tout d'abord le récepteur nucléaire NOR1 qui joue sur la balance entre macrophages de type M1 ou M2 puis le facteur TLE1 qui est par ailleurs capable d'interagir avec d'autres protéines et pourrait ainsi constituer une toute nouvelle voie de compréhension de la fonction des macrophages.

Identifier des nouveaux acteurs impliqués dans la modulation du phénotype des macrophages est important car il apparaît maintenant que, plutôt que se focaliser sur le nombre de macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose, il faut s'orienter vers leurs phénotypes fonctionnels et leurs proportions relatives afin d'évaluer l'effet bénéfique ou néfaste de ces cellules dans le développement et l'évolution de la pathologie de l'athérosclérose.

Nous savons à présent que les modulateurs du phénotype des macrophages sont multiples et variés, allant des facteurs de transcription aux récepteurs nucléaires, aux miRNA jusqu'aux facteurs humoraux. Certains parmi eux possèdent des implications pharmacologiques ; c'est le cas des ligands synthétiques de PPAR γ , rassemblés sous le nom de thiazolidinediones (TZD) ou glitazones, une classe d'antidiabétiques oraux (Forman, et al. 1995; Willson, et al. 2000). Une étude réalisé en 2007 a montré que les TZD seraient capable de programmer les cellules

périphérique mononuclées du sang vers un phénotype M2 chez l'homme (Bouhlef, et al. 2007). Plus récemment, Faine et collègues ont mis en évidence qu'un autre dérivé de TZD, le SF3, présente des effets anti-inflammatoires dans les macrophages murins (Faine, et al. 2011). Les données issues de ce travail de thèse vont constituer une base supplémentaire pour le développement de nouvelles pistes thérapeutiques agissant sur la balance entre les différents phénotypes fonctionnels des macrophages.

BIBLIOGRAPHIE

Aghaallaei, N., B. Bajoghli, I. Walter and T. Czerny 2005 Duplicated members of the Groucho/Tle gene family in fish. *Dev Dyn* 234(1):143-50.

Ahn, J. W., Y. A. Lee, J. H. Ahn and C. Y. Choi 2009 Covalent conjugation of Groucho with SUMO-1 modulates its corepressor activity. *Biochem Biophys Res Commun* 379(1):160-5.

Ait-Oufella, H., B. L. Salomon, S. Potteaux, A. K. Robertson, P. Gourdy, J. Zoll, R. Merval, B. Esposito, J. L. Cohen, S. Fisson, R. A. Flavell, G. K. Hansson, D. Klatzmann, A. Tedgui and Z. Mallat 2006 Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med* 12(2):178-80.

Akimaru, H., D. X. Hou and S. Ishii 1997 Drosophila CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet* 17(2):211-4.

Allander, S. V., P. B. Illei, Y. Chen, C. R. Antonescu, M. Bittner, M. Ladanyi and P. S. Meltzer 2002 Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am J Pathol* 161(5):1587-95.

Allen, T., M. van Tuyl, P. Iyengar, S. Jothy, M. Post, M. S. Tsao and C. G. Lobe 2006 Grg1 acts as a lung-specific oncogene in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 66(3):1294-301.

Aloisi, F. 2001 Immune function of microglia. *Glia* 36(2):165-79.

Anderson, C. F., J. S. Gerber and D. M. Mosser 2002 Modulating macrophage function with IgG immune complexes. *J Endotoxin Res* 8(6):477-81.

Anderson, K. V. 1998 Pinning down positional information: dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo. *Cell* 95(4):439-42.

Arkenbout, E. K., V. de Waard, M. van Bragt, T. A. van Achterberg, J. M. Grimbergen, B. Pichon, H. Pannekoek and C. J. de Vries 2002 Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation* 106(12):1530-5.

Arredondo, C., M. Orellana, A. Vecchiola, L. A. Pereira, L. Galdames and M. E. Andres 2013 PIASgamma enhanced SUMO-2 modification of Nurr1 activation-function-1 domain limits Nurr1 transcriptional synergy. *PLoS One* 8(1):e55035.

Au, W. S., V. A. Payne, S. O'Rahilly and J. J. Rochford 2008 The NR4A family of orphan nuclear receptors are not required for adipogenesis. *Int J Obes (Lond)* 32(2):388-92.

Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau and F. Geissmann 2007 Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317(5838):666-70.

Auffray, C., M. H. Sieweke and F. Geissmann 2009 Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-92.

Babaev, V. R., H. Ishiguro, L. Ding, P. G. Yancey, D. E. Dove, W. J. Kovacs, C. F. Semenkovich, S. Fazio and M. F. Linton 2007 Macrophage expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 116(12):1404-12.

Bajoghli, B. 2007 Evolution of the Groucho/Tle gene family: gene organization and duplication events. *Dev Genes Evol* 217(8):613-8.

Baker, K. D., L. M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J. A. Caravella, M. H. Lambert, J. L. Reinking, H. Krause, C. S. Thummel, T. M. Willson and D. J. Mangelsdorf 2003 The *Drosophila* orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway. *Cell* 113(6):731-42.

Barlis, P., P. W. Serruys, A. Devries and E. Regar 2008 Optical coherence tomography assessment of vulnerable plaque rupture: predilection for the plaque 'shoulder'. *Eur Heart J* 29(16):2023.

Belvin, M. P. and K. V. Anderson 1996 A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:393-416.

Berliner, J. A. and J. W. Heinecke 1996 The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20(5):707-27.

Bey, E. A. and M. K. Cathcart 2000 In vitro knockout of human p47phox blocks superoxide anion production and LDL oxidation by activated human monocytes. *J Lipid Res* 41(3):489-95.

Bhattacharjee, A., B. Xu, D. A. Frank, G. M. Feldman and M. K. Cathcart 2006 Monocyte 15-lipoxygenase expression is regulated by a novel cytosolic signaling complex with protein kinase C delta and tyrosine-phosphorylated Stat3. *J Immunol* 177(6):3771-81.

Biswas, S. K., L. Gangi, S. Paul, T. Schioppa, A. Saccani, M. Sironi, B. Bottazzi, A. Doni, B. Vincenzo, F. Pasqualini, L. Vago, M. Nebuloni, A. Mantovani and A. Sica 2006 A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* 107(5):2112-22.

Boisvert, W. A. 2004 The participation of chemokines in atherosclerosis. *Discov Med* 4(23):288-92.

Boldingh Debernard, K. A., G. H. Mathisen and R. E. Paulsen 2012 Differences in NGFI-B, Nurr1, and NOR-1 expression and nucleocytoplasmic translocation in glutamate-treated neurons. *Neurochem Int* 61(1):79-88.

Bonta, P. I., H. L. Matlung, M. Vos, S. L. Peters, H. Pannekoek, E. N. Bakker and C. J. de Vries 2010 Nuclear receptor Nur77 inhibits vascular outward remodelling and reduces macrophage accumulation and matrix metalloproteinase levels. *Cardiovasc Res* 87(3):561-8.

Bonta, P. I., C. M. van Tiel, M. Vos, T. W. Pols, J. V. van Thienen, V. Ferreira, E. K. Arkenbout, J. Seppen, C. A. Spek, T. van der Poll, H. Pannekoek and C. J. de Vries 2006 Nuclear receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(10):2288-94.

Bories, G., S. Colin, J. Vanhoutte, B. Derudas, C. Copin, M. Fanchon, M. Daoudi, L. Belloy, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi 2013a Liver X Receptor (LXR) Activation Stimulates Iron Export in Human Alternative Macrophages. *Circ Res* 113(11):1196-1205.

Bouhrel, M. A., B. Derudas, E. Rigamonti, R. Dievert, J. Brozek, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude, G. Torpier, N. Marx, B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi 2007 PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metabolism* 6:137-143.

Boyle, J. J., M. Johns, T. Kampfer, A. T. Nguyen, L. Game, D. J. Schaer, J. C. Mason and D. O. Haskard 2012 Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. *Circ Res* 110(1):20-33.

Boyle, J. J., M. Johns, J. Lo, A. Chiodini, N. Ambrose, P. C. Evans, J. C. Mason and D. O. Haskard 2011 Heme induces heme oxygenase 1 via Nrf2: role in the homeostatic macrophage response to intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(11):2685-91.

Brantjes, H., J. Roose, M. van De Wetering and H. Clevers 2001 All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res* 29(7):1410-9.

Brickman, J. M., C. M. Jones, M. Clements, J. C. Smith and R. S. Beddington 2000 Hex is a transcriptional repressor that contributes to anterior identity and suppresses Spemann organiser function. *Development* 127(11):2303-15.

Brocheriou, I., S. Maouche, H. Durand, V. Braunersreuther, G. Le Naour, A. Gratchev, F. Koskas, F. Mach, J. Kzhyshkowska and E. Ninio 2011 Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 214(2):316-24.

- Brown, A. J., E. L. Mander, I. C. Gelissen, L. Kritharides, R. T. Dean and W. Jessup 2000 Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes. *J Lipid Res* 41(2):226-37.
- Brunquell, C., H. Biliran, S. Jennings, S. K. Ireland, R. Chen and E. Ruoslahti 2012 TLE1 is an anoikis regulator and is downregulated by Bit1 in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 10(11):1482-95.
- Bubulya, A., S. C. Wise, X. Q. Shen, L. A. Burmeister and L. Shemshedini 1996 c-Jun can mediate androgen receptor-induced transactivation. *J Biol Chem* 271(40):24583-9.
- Buono, C., C. J. Binder, G. Stavrakis, J. L. Witztum, L. H. Glimcher and A. H. Lichtman 2005 T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5):1596-601.
- Buscarlet, M. and S. Stifani 2007 The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol* 17(7):353-61.
- Byles, V., A. J. Covarrubias, I. Ben-Sahra, D. W. Lamming, D. M. Sabatini, B. D. Manning and T. Horng 2013 The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun* 4:2834.
- Caballero, A. E., R. Saouaf, S. C. Lim, O. Hamdy, K. Abou-Elenin, C. O'Connor, F. W. Logerfo, E. S. Horton and A. Veves 2003 The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism* 52(2):173-180.
- Cai, Y., P. D. Brophy, I. Levitan, S. Stifani and G. R. Dressler 2003 Groucho suppresses Pax2 transactivation by inhibition of JNK-mediated phosphorylation. *Embo J* 22(20):5522-9.
- Caligiuri, G., A. Nicoletti, B. Poirier and G. K. Hansson 2002 Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 109(6):745-53.

Cancello, R., C. Henegar, N. Viguerie, S. Taleb, C. Poitou, C. Rouault, M. Coupaye, V. Pelloux, D. Hugol, J. L. Bouillot, A. Bouloumie, G. Barbatelli, S. Cinti, P. A. Svensson, G. S. Barsh, J. D. Zucker, A. Basdevant, D. Langin and K. Clement 2005 Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54(8):2277-86.

Canon, J. and U. Banerjee 2003 In vivo analysis of a developmental circuit for direct transcriptional activation and repression in the same cell by a Runx protein. *Genes Dev* 17(7):838-43.

Cao, X., W. Liu, F. Lin, H. Li, S. K. Kolluri, B. Lin, Y. H. Han, M. I. Dawson and X. K. Zhang 2004 Retinoid X receptor regulates Nur77/TR3-dependent apoptosis by modulating its nuclear export and mitochondrial targeting. *Mol Cell Biol* 24(22):9705-25.

Cara, C. J., A. S. Pena, M. Sans, L. Rodrigo, M. Guerrero-Esteo, J. Hinojosa, J. Garcia-Paredes and L. G. Guijarro 2004 Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 10(11):RA247-54.

Carlin, L. M., E. G. Stamatiades, C. Auffray, R. N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, C. C. Hedrick, H. T. Cook, S. Diebold and F. Geissmann 2013 Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* 153(2):362-75.

Carstea, E. D., J. A. Morris, K. G. Coleman, S. K. Loftus, D. Zhang, C. Cummings, J. Gu, M. A. Rosenfeld, W. J. Pavan, D. B. Krizman, J. Nagle, M. H. Polymeropoulos, S. L. Sturley, Y. A. Ioannou, M. E. Higgins, M. Comly, A. Cooney, A. Brown, C. R. Kaneski, E. J. Blanchette-Mackie, N. K. Dwyer, E. B. Neufeld, T. Y. Chang, L. Liscum, D. A. Tagle and et al.1997 Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277(5323):228-231.

Casagrande, V., R. Menghini, S. Menini, A. Marino, V. Marchetti, M. Cavallera, M. Fabrizi, M. L. Hribal, G. Pugliese, P. Gentileschi, O. Schillaci, O. Porzio, D. Lauro, P. Sbraccia, R. Lauro and M. Federici 2012 Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(1):74-81.

Castro, D. S., M. Arvidsson, M. Bondesson Bolin and T. Perlmann 1999 Activity of the Nurr1 carboxyl-terminal domain depends on cell type and integrity of the activation function 2. *J Biol Chem* 274(52):37483-90.

Cavallo, R. A., R. T. Cox, M. M. Moline, J. Roose, G. A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer and A. Bejsovec 1998 *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395(6702):604-8.

Chao, L. C., S. J. Bensinger, C. J. Villanueva, K. Wroblewski and P. Tontonoz 2008 Inhibition of adipocyte differentiation by Nur77, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 22(12):2596-608.

Chao, L. C., E. Soto, C. Hong, A. Ito, L. Pei, A. Chawla, O. M. Conneely, R. K. Tangirala, R. M. Evans and P. Tontonoz 2013 Bone marrow NR4A expression is not a dominant factor in the development of atherosclerosis or macrophage polarization in mice. *J Lipid Res* 54(3):806-15.

Chatterjee, S., A. K. Bhunia, A. Snowden and H. Han 1997 Oxidized low density lipoproteins stimulate galactosyltransferase activity, ras activation, p44 mitogen activated protein kinase and c-fos expression in aortic smooth muscle cells. *Glycobiology* 7(5):703-10.

Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans and D. J. Mangelsdorf 2001 Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294(5548):1866-70.

Chen, G. and A. J. Courey 2000 Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression. *Gene* 249(1-2):1-16.

Chen, G., J. Fernandez, S. Mische and A. J. Courey 1999 A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* 13(17):2218-30.

Chen, G., P. H. Nguyen and A. J. Courey 1998 A role for Groucho tetramerization in transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 18(12):7259-68.

Chen, J. D. and R. M. Evans 1995 A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377(6548):454-7.

Chinetti, G., S. Griglio, M. Antonucci, I. Pineda Torra, P. Delerive, Z. Majd, J. C. Fruchart, J. Chapman, J. Najib and B. Staels 1998 Activation of peroxisome proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273:25573-25580.

Chinetti-Gbaguidi, G., M. Baron, M. A. Bouhrel, J. Vanhoutte, C. Copin, Y. Sebti, B. Derudas, T. Mayi, G. Bories, A. Tailleux, S. Haulon, C. Zawadzki, B. Jude and B. Staels 2011 Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR $\{\gamma\}$ and LXR $\&\alpha$; Pathways. *Circ Res* 108(8):985-95.

Chintharlapalli, S., R. Burghardt, S. Papineni, S. Ramaiah, K. Yoon and S. Safe 2005 Activation of Nur77 by selected 1,1-Bis(3'-indolyl)-1-(p-substituted phenyl)methanes induces apoptosis through nuclear pathways. *J Biol Chem* 280(26):24903-14.

Cho, K. Y., H. Miyoshi, S. Kuroda, H. Yasuda, K. Kamiyama, J. Nakagawara, M. Takigami, T. Kondo and T. Atsumi 2013 The phenotype of infiltrating macrophages influences arteriosclerotic plaque vulnerability in the carotid artery. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 22(7):910-8.

Cho, S. D., P. Lei, M. Abdelrahim, K. Yoon, S. Liu, J. Guo, S. Papineni, S. Chintharlapalli and S. Safe 2008 1,1-bis(3'-indolyl)-1-(p-methoxyphenyl)methane activates Nur77-independent proapoptotic responses in colon cancer cells. *Mol Carcinog* 47(4):252-63.

Choi, C. Y., Y. H. Kim, Y. O. Kim, S. J. Park, E. A. Kim, W. Riemenschneider, K. Gajewski, R. A. Schulz and Y. Kim 2005 Phosphorylation by the DHIPK2 protein kinase modulates the corepressor activity of Groucho. *J Biol Chem* 280(22):21427-36.

Cinnamon, E., A. Helman, R. Ben-Haroush Schyr, A. Orian, G. Jimenez and Z. Paroush 2008 Multiple RTK pathways downregulate Groucho-mediated repression in Drosophila embryogenesis. *Development* 135(5):829-37.

Cogle, J. E. and J. D. Tarling 1984 The proliferation kinetics of pulmonary alveolar macrophages. *J Leukoc Biol* 35(3):317-27.

Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi and B. Staels 2014 Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev* 262(1):153-66.

Courey, A. J. and J. D. Huang 1995 The establishment and interpretation of transcription factor gradients in the Drosophila embryo. *Biochim Biophys Acta* 1261(1):1-18.

Courey, A. J. and S. Jia 2001 Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* 15(21):2786-96.

Cudejko, C., K. Wouters, L. Fuentes, S. A. Hannou, C. Paquet, K. Bantubungi, E. Bouchaert, J. Vanhoutte, S. Fleury, P. Remy, A. Tailleux, G. Chinetti-Gbaguidi, D. Dombrowicz, B. Staels and R. Paumelle 2011 p16INK4a deficiency promotes IL-4-induced polarization and inhibits proinflammatory signaling in macrophages. *Blood* 118(9):2556-66.

Cuevas, I. C., A. L. Slocum, P. Jun, J. F. Costello, A. W. Bollen, G. J. Riggins, M. W. McDermott and A. Lal 2005 Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Res* 65(12):5070-5.

Dansky, H. M., S. A. Charlton, M. M. Harper and J. D. Smith 1997 T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9):4642-6.

Dastidar, S. G., S. Narayanan, S. Stifani and S. R. D'Mello 2012 Transducin-like enhancer of Split-1 (TLE1) combines with Forkhead box protein G1 (FoxG1) to promote neuronal survival. *J Biol Chem* 287(18):14749-59.

Date, D., R. Das, G. Narla, D. I. Simon, M. K. Jain and G. H. Mahabeleshwar 2014 Kruppel-like Transcription Factor 6 Regulates Inflammatory Macrophage Polarization. *J Biol Chem* 289(15):10318-29.

Davies, M. J., P. D. Richardson, N. Woolf, D. R. Katz and J. Mann 1993 Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 69(5):377-81.

De Bosscher, K., W. Vanden Berghe and G. Haegeman 2003 The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 24(4):488-522.

de Vries, C. J., T. A. van Achterberg, A. J. Horrevoets, J. W. ten Cate and H. Pannekoek 2000 Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *J Biol Chem* 275(31):23939-47.

Delerive, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, J. C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman and B. Staels 1999a Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274(45):32048-54.

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B 1999b PPAR α negatively regulates the vascular wall inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- κ B and AP-1. *J Biol Chem* 274:32048-32054.

Delerive, P., F. Martin-Nizard, G. Chinetti, F. Trottein, J. C. Fruchart, P. Duriez and B. Staels 1999 PPAR activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the AP-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402.

Despres, J. P. and A. Marette 1994 Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol* 5(4):274-89.

Diefenbacher, M., S. Sekula, C. Heilbock, J. V. Maier, M. Litfin, H. van Dam, M. Castellazzi, P. Herrlich and O. Kassel 2008 Restriction to Fos family members of Trip6-dependent coactivation and glucocorticoid receptor-dependent trans-repression of activator protein-1. *Mol Endocrinol* 22(8):1767-80.

Dintilhac, A. and J. Bernues 2002 HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acid sequences. *J Biol Chem* 277(9):7021-8.

Dominguez, P. M. and C. Ardavin 2010 Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol Rev* 234(1):90-104.

Dubnicoff, T., S. A. Valentine, G. Chen, T. Shi, J. A. Lengyel, Z. Paroush and A. J. Courey 1997 Conversion of dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev* 11(22):2952-7.

Duewell, P., H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, G. Vladimer, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nunez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K. A. Fitzgerald, K. L. Rock, K. J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung and E. Latz 2010 NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464(7293):1357-61.

Eberhard, D., G. Jimenez, B. Heavey and M. Busslinger 2000 Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. *Embo J* 19(10):2292-303.

Edmondson, D. G., M. M. Smith and S. Y. Roth 1996 Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev* 10(10):1247-59.

Edmondson, D. G., W. Zhang, A. Watson, W. Xu, J. R. Bone, Y. Yu, D. Stillman and S. Y. Roth 1998 In vivo functions of histone acetylation/deacetylation in Tup1p repression and Gcn5p activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:459-68.

El Hadri, K., D. F. Mahmood, D. Couchie, I. Jguirim-Souissi, F. Genze, V. Diderot, T. Syrovets, O. Lunov, T. Simmet and M. Rouis 2012 Thioredoxin-1 promotes anti-

inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(6):1445-52.

Epelman, S., K. J. Lavine and G. J. Randolph 2014 Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41(1):21-35.

Erbel, C., M. Tyka, C. M. Helmes, M. Akhavanpoor, G. Rupp, G. Domschke, F. Linden, A. Wolf, A. Doesch, F. Lasitschka, H. A. Katus and C. A. Gleissner 2014 CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo. *Innate Immun.* In Press

Fahrner, T. J., S. L. Carroll and J. Milbrandt 1990 The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol* 10(12):6454-9.

Faine, L. A., M. Rudnicki, F. A. Cesar, B. L. Heras, L. Bosca, E. S. Souza, M. Z. Hernandez, S. L. Galdino, M. C. Lima, I. R. Pitta and D. S. Abdalla 2011 Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages. *Curr Med Chem* 18(22):3351-60.

Falk, E. 1985 Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 71(4):699-708.

Fang, L., R. Harkewicz, K. Hartvigsen, P. Wiesner, S. H. Choi, F. Almazan, J. Pattison, E. Deer, T. Sayaphupha, E. A. Dennis, J. L. Witztum, S. Tsimikas and Y. I. Miller 2010 Oxidized cholesteryl esters and phospholipids in zebrafish larvae fed a high cholesterol diet: macrophage binding and activation. *J Biol Chem* 285(42):32343-51.

Farboud, B. and M. L. Privalsky 2004 Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain. *Mol Endocrinol* 18(12):2839-53.

Feig, J. E., S. Parathath, J. X. Rong, S. L. Mick, Y. Vengrenyuk, L. Grauer, S. G. Young and E. A. Fisher 2011 Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the

content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques. *Circulation* 123(9):989-98.

Feig, J. E., J. X. Rong, R. Shamir, M. Sanson, Y. Vengrenyuk, J. Liu, K. Rayner, K. Moore, M. Garabedian and E. A. Fisher 2011 HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17):7166-71.

Feig, J. E., Y. Vengrenyuk, V. Reiser, C. Wu, A. Statnikov, C. F. Aliferis, M. J. Garabedian, E. A. Fisher and O. Puig 2012 Regression of atherosclerosis is characterized by broad changes in the plaque macrophage transcriptome. *PLoS One* 7(6):e39790.

Felton, C. V., D. Crook, M. J. Davies and M. F. Oliver 1997 Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(7):1337-45.

Ferrante, C. J., G. Pinhal-Enfield, G. Elson, B. N. Cronstein, G. Hasko, S. Outram and S. J. Leibovich 2013 The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation* 36(4):921-31.

Finn, A. V., M. Nakano, R. Polavarapu, V. Karmali, O. Saeed, X. Zhao, S. Yazdani, F. Otsuka, T. Davis, A. Habib, J. Narula, F. D. Kolodgie and R. Virmani 2012 Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 59(2):166-77.

Fisher, A. L. and M. Caudy 1998 Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12(13):1931-40.

Flores-Saib, R. D. and A. J. Courey 2000 Analysis of Groucho-histone interactions suggests mechanistic similarities between Groucho- and Tup1-mediated repression. *Nucleic Acids Res* 28(21):4189-96.

Flores-Saaib, R. D., S. Jia and A. J. Courey 2001 Activation and repression by the C-terminal domain of Dorsal. *Development* 128(10):1869-79.

Forman, B. M., J. Chen, B. Blumberg, S. A. Kliewer, R. Henshaw, E. S. Ong and R. M. Evans 1994 Cross-talk among ROR α and the Rev-erb family of orphan nuclear receptors. *Molecular Endocrinology* 8:1253-1260.

Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman and R. M. Evans 1995 15-Deoxy- Δ 12,14 prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83:803-812.

Fowkes, F. G., D. Rudan, I. Rudan, V. Aboyans, J. O. Denenberg, M. M. McDermott, P. E. Norman, U. K. Sampson, L. J. Williams, G. A. Mensah and M. H. Criqui 2013 Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet* 382(9901):1329-40.

Frisch, S. M. 1999 Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-containing proteins in anoikis. *Curr Biol* 9(18):1047-9.

Frisch, S. M. and R. A. Screaton 2001 Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13(5):555-62.

Fu, Y., L. Luo, N. Luo, X. Zhu and W. T. Garvey 2007 NR4A orphan nuclear receptors modulate insulin action and the glucose transport system: potential role in insulin resistance. *J Biol Chem* 282(43):31525-33.

Gabriels, K., S. Hoving, M. J. Gijbels, J. F. Pol, J. A. Te Poele, E. A. Biessen, M. J. Daemen, F. A. Stewart and S. Heeneman 2014 Irradiation of existing atherosclerotic lesions increased inflammation by favoring pro-inflammatory macrophages. *Radiother Oncol* 110(3):455-60.

Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark and P. Libby 1994 Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94(6):2493-503.

Gallardo-Soler, A., C. Gomez-Nieto, M. L. Campo, C. Marathe, P. Tontonoz, A. Castrillo and I. Corraliza 2008 Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol* 22(6):1394-402.

Gao, X., T. Chandra, M. O. Gratton, I. Quelo, J. Prud'homme, S. Stifani and R. St-Arnaud 2001 HES6 acts as a transcriptional repressor in myoblasts and can induce the myogenic differentiation program. *J Cell Biol* 154(6):1161-71.

Garcia-Yague, A. J., P. Rada, A. I. Rojo, I. Lastres-Becker and A. Cuadrado 2012 Nuclear import and export signals control the subcellular localization of Nurr1 protein in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 288(8):5506-17.

Gautier, E. L. and L. Yvan-Charvet 2014 Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels. *Immunol Rev* 262(1):85-95.

Geiss-Friedlander, R. and F. Melchior 2007 Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12):947-56.

Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman 2003 Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71-82.

Gelissen, I. C., M. Harris, K. A. Rye, C. Quinn, A. J. Brown, M. Kockx, S. Cartland, M. Packianathan, L. Kritharides and W. Jessup 2006 ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(3):534-40.

Germain, P., C. Regnaut and S. Amokrane 2003 Is the binary hard-sphere mixture a good reference system for sterically stabilized colloids? *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 67(6 Pt 1):061101.

Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding and V. Laudet 2006 Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 58(4):685-704.

Ghisletti, S., W. Huang, S. Ogawa, G. Pascual, M. E. Lin, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass 2007 Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol Cell* 25(1):57-70.

Ghosh, H. S., J. V. Spencer, B. Ng, M. W. McBurney and P. D. Robbins 2007 Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochem J* 408(1):105-11.

Giguere, V., N. Yang, P. Segui and R. M. Evans 1988 Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* 331(6151):91-4.

Ginhoux, F., M. Greter, M. Leboeuf, S. Nandi, P. See, S. Gokhan, M. F. Mehler, S. J. Conway, L. G. Ng, E. R. Stanley, I. M. Samokhvalov and M. Merad 2010 Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330(6005):841-5.

Ginsberg, H. N. and C. Tuck 2001 Diabetes and dyslipidemia. *Curr Diab Rep* 1(2):93-5.

Glass, C. K. and J. L. Witztum 2001 Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104(4):503-16.

Gleissner, C. A., I. Shaked, C. Erbel, D. Bockler, H. A. Katus and K. Ley 2010 CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res* 106(1):203-11.

Gleissner, C. A., I. Shaked, K. M. Little and K. Ley 2010 CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 184(9):4810-8.

Goenka, S. and M. H. Kaplan 2011 Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res* 50(1):87-96.

Goldstein, J. L., T. Kita and M. S. Brown 1983 Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 309(5):288-96.

Goldstein, R. E., G. Jimenez, O. Cook, D. Gur and Z. Paroush 1999 Hucklebein repressor activity in *Drosophila* terminal patterning is mediated by Groucho. *Development* 126(17):3747-55.

Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji and U. P. Thorgeirsson 1997 Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 74(2):111-22.

Gordon, S. 2002 Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111(7):927-30.

Gordon, S. and F. O. Martinez 2010 Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32(5):593-604.

Grbavec, D., R. Lo, Y. Liu, A. Greenfield and S. Stifani 1999 Groucho/transducin-like enhancer of split (TLE) family members interact with the yeast transcriptional co-repressor SSN6 and mammalian SSN6-related proteins: implications for evolutionary conservation of transcription repression mechanisms. *Biochem J* 337 (Pt 1):13-7.

Grinberg, S., G. Hasko, D. Wu and S. J. Leibovich 2009 Suppression of PLCbeta2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* 175(6):2439-53.

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

Guilliams, M., I. De Kleer, S. Henri, S. Post, L. Vanhoutte, S. De Prijck, K. Deswarte, B. Malissen, H. Hammad and B. N. Lambrecht 2013 Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210(10):1977-92.

Guiral, M., K. Bess, G. Goodwin and P. S. Jayaraman 2001 PRH represses transcription in hematopoietic cells by at least two independent mechanisms. *J Biol Chem* 276(4):2961-70.

Gutcher, I. and B. Becher 2007 APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 117(5):1119-27.

Hamers, A. A., M. Vos, F. Rassam, G. Marinkovic, K. Kurakula, P. J. van Gorp, M. P. de Winther, M. J. Gijbels, V. de Waard and C. J. de Vries 2012 Bone marrow-specific deficiency of nuclear receptor Nur77 enhances atherosclerosis. *Circ Res* 110(3):428-38.

Hanna, R. N., L. M. Carlin, H. G. Hubbeling, D. Nackiewicz, A. M. Green, J. A. Punt, F. Geissmann and C. C. Hedrick 2011 The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol* 12(8):778-85.

Hanna, R. N., I. Shaked, H. G. Hubbeling, J. A. Punt, R. Wu, E. Herrley, C. Zaugg, H. Pei, F. Geissmann, K. Ley and C. C. Hedrick 2012 NR4A1 (Nur77) deletion polarizes macrophages toward an inflammatory phenotype and increases atherosclerosis. *Circ Res* 110(3):416-27.

Harant, H. and I. J. Lindley 2004 Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor-kappaB. *Nucleic Acids Res* 32(17):5280-90.

Harder, M. N., R. Ribel-Madsen, J. M. Justesen, T. Sparso, E. A. Andersson, N. Grarup, T. Jorgensen, A. Linneberg, T. Hansen and O. Pedersen 2013 Type 2 diabetes risk alleles near BCAR1 and in ANK1 associate with decreased beta-cell function whereas risk alleles near ANKRD55 and GRB14 associate with decreased insulin sensitivity in the Danish Inter99 cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 98(4):E801-6.

Haschemi, A., P. Kosma, L. Gille, C. R. Evans, C. F. Burant, P. Starkl, B. Knapp, R. Haas, J. A. Schmid, C. Jandl, S. Amir, G. Lubec, J. Park, H. Esterbauer, M. Bilban, L. Brizuela, J. A. Pospisilik, L. E. Otterbein and O. Wagner 2012 The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab* 15(6):813-26.

Hashimoto, D., A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M. B. Beasley, M. Leboeuf, C. D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S. W. Boyer, E. C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. Garcia-Sastre, E. R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette and M. Merad 2013 Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38(4):792-804.

Hasson, P., N. Egoz, C. Winkler, G. Volohonsky, S. Jia, T. Dinur, T. Volk, A. J. Courey and Z. Paroush 2005 EGFR signaling attenuates Groucho-dependent repression to antagonize Notch transcriptional output. *Nat Genet* 37(1):101-5.

Haubrich, W. S. 2004 Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology* 127(1):16.

Hazel, T. G., R. Misra, I. J. Davis, M. E. Greenberg and L. F. Lau 1991 Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment. *Mol Cell Biol* 11(6):3239-46.

Hazel, T. G., D. Nathans and L. F. Lau 1988 A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22):8444-8.

Hedvat, C. V. and S. G. Irving 1995 The isolation and characterization of MINOR, a novel mitogen-inducible nuclear orphan receptor. *Mol Endocrinol* 9(12):1692-700.

Hellmann, J., Y. Tang, M. Kosuri, A. Bhatnagar and M. Spite 2011 Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. *Faseb J*.

Herman, M. P., G. K. Sukhova, P. Libby, N. Gerdes, N. Tang, D. B. Horton, M. Kilbride, R. E. Breitbart, M. Chun and U. Schonbeck 2001 Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 104(16):1899-904.

Herschbach, B. M., M. B. Arnaud and A. D. Johnson 1994 Transcriptional repression directed by the yeast alpha 2 protein in vitro. *Nature* 370(6487):309-11.

Hilgendorf, I., L. M. Gerhardt, T. C. Tan, C. Winter, T. A. Holderried, B. G. Chousterman, Y. Iwamoto, R. Liao, A. Zirlik, M. Scherer-Crosbie, C. C. Hedrick, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder and F. K. Swirski 2014 Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res* 114(10):1611-22.

Hittelman, A. B., D. Burakov, J. A. Iniguez-Lluhi, L. P. Freedman and M. J. Garabedian 1999 Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *Embo J* 18(19):5380-8.

Hoffman, B. G., B. Zavaglia, M. Beach and C. D. Helgason 2008 Expression of Groucho/TLE proteins during pancreas development. *BMC Dev Biol* 8:81.

Holmes, K. A., A. Hurtado, G. D. Brown, R. Launchbury, C. S. Ross-Innes, J. Hadfield, D. T. Odom and J. S. Carroll 2012 Transducin-like enhancer protein 1 mediates estrogen receptor binding and transcriptional activity in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(8):2748-53.

Hong, C. Y., J. H. Park, R. S. Ahn, S. Y. Im, H. S. Choi, J. Soh, S. H. Mellon and K. Lee 2004 Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 24(7):2593-604.

Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass and et al.1995 Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377(6548):397-404.

Hu, X. and M. A. Lazar 1999The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402(6757):93-6.

Hu, X., G. Liu, Y. Hou, J. Shi, L. Zhu, D. Jin, J. Peng and Y. Zhao 2012 Induction of M2-like macrophages in recipient NOD-scid mice by allogeneic donor CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 9(6):464-72.

Hughes, J. E., S. Srinivasan, K. R. Lynch, R. L. Proia, P. Ferdek and C. C. Hedrick 2008 Sphingosine-1-phosphate induces an antiinflammatory phenotype in macrophages. *Circ Res* 102(8):950-8.

Huopio, H., H. Cederberg, J. Vangipurapu, H. Hakkarainen, M. Paakkonen, T. Kuulasmaa, S. Heinonen and M. Laakso 2013 Association of risk variants for type 2 diabetes and hyperglycemia with gestational diabetes. *Eur J Endocrinol* 169(3):291-7.

Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions 2004 Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 4(6):432-44.

Ingersoll, M. A., R. Spanbroek, C. Lottaz, E. L. Gautier, M. Frankengerger, R. Hoffmann, R. Lang, M. Haniffa, M. Collin, F. Tacke, A. J. Habenicht, L. Ziegler-Heitbrock and G. J. Randolph 2010 Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115(3):e10-9.

Ishibashi, M., S. L. Ang, K. Shiota, S. Nakanishi, R. Kageyama and F. Guillemot 1995 Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to up-regulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe neural tube defects. *Genes Dev* 9(24):3136-48.

Ishibashi, T., K. Yokoyama, J. Shindo, Y. Hamazaki, Y. Endo, T. Sato, S. Takahashi, Y. Kawarabayasi, M. Shiomi and T. Yamamoto 1994 Potent cholesterol-lowering effect by human granulocyte-macrophagecolony-stimulating factor in rabbits. Possible implications of enhancement of macrophage functions and an increase in mRNA for VLDL receptor. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14:1534-41.

Italiani, P. and D. Boraschi 2014 From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5:514.

Jan, Y., M. Matter, J. T. Pai, Y. L. Chen, J. Pilch, M. Komatsu, E. Ong, M. Fukuda and E. Ruoslahti 2004 A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors. *Cell* 116(5):751-62.

Jenkins, S. J., D. Ruckerl, P. C. Cook, L. H. Jones, F. D. Finkelman, N. van Rooijen, A. S. MacDonald and J. E. Allen 2011 Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* 332(6035):1284-8.

Jennings, B. H., S. M. Wainwright and D. Ish-Horowicz 2008 Differential in vivo requirements for oligomerization during Groucho-mediated repression. *EMBO Rep* 9(1):76-83.

Jeoung, M., C. Lee, I. Ji and T. H. Ji 2007 Trans-activation, cis-activation and signal selection of gonadotropin receptors. *Mol Cell Endocrinol* 260-262:137-43.

Ji, I., C. Lee, Y. Song, P. M. Conn and T. H. Ji 2002 Cis- and trans-activation of hormone receptors: the LH receptor. *Mol Endocrinol* 16(6):1299-308.

Jimenez, G., C. P. Verrijzer and D. Ish-Horowicz 1999 A conserved motif in goosecoid mediates groucho-dependent repression in Drosophila embryos. *Mol Cell Biol* 19(3):2080-7.

Jonat, C., H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta and P. Herrlich 1990 Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62(6):1189-204.

Ju, B. G., D. Solum, E. J. Song, K. J. Lee, D. W. Rose, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld 2004 Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119(6):815-29.

Kadl, A., A. K. Meher, P. R. Sharma, M. Y. Lee, A. C. Doran, S. R. Johnstone, M. R. Elliott, F. Gruber, J. Han, W. Chen, T. Kensler, K. S. Ravichandran, B. E. Isakson, B. R. Wamhoff and N. Leitinger 2010 Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ Res* 107(6):737-46.

Kagoshima, H., K. Shigesada, M. Satake, Y. Ito, H. Miyoshi, M. Ohki, M. Pepling and P. Gergen 1993 The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* 9(10):338-41.

Kang, K., S. M. Reilly, V. Karabacak, M. R. Gangl, K. Fitzgerald, B. Hatano and C. H. Lee 2008 Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metab* 7(6):485-95.

Kapourchali, F. R., G. Surendiran, L. Chen, E. Uitz, B. Bahadori and M. H. Moghadasian 2014 Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases* 2(5):126-32.

Katagiri, Y., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans, K. Ozato and G. Guroff 2000 Modulation of retinoid signalling through NGF-induced nuclear export of NGFI-B. *Nat Cell Biol* 2(7):435-40.

Khallou-Laschet, J., A. Varthaman, G. Fornasa, C. Compain, A. T. Gaston, M. Clement, M. Dussiot, O. Levillain, S. Graff-Dubois, A. Nicoletti and G. Caligiuri 2010 Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One* 5(1):e8852.

Kim, K., N. Thu, B. Saville and S. Safe 2003 Domains of estrogen receptor alpha (ERalpha) required for ERalpha/Sp1-mediated activation of GC-rich promoters by estrogens and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17(5):804-17.

Kornberg, R. D. 2005 Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci* 30(5):235-9.

Kosteli, A., E. Sugaru, G. Haemmerle, J. F. Martin, J. Lei, R. Zechner and A. W. Ferrante, Jr. 2010 Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest* 120(10):3466-79.

Kratz, M., B. R. Coats, K. B. Hisert, D. Hagman, V. Mutskov, E. Peris, K. Q. Schoenfelt, J. N. Kuzma, I. Larson, P. S. Billing, R. W. Landerholm, M. Crouthamel, D. Gozal, S. Hwang, P. K. Singh and L. Becker 2014 Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell Metab* 20(4):614-25.

Kuchin, S. and M. Carlson 1998 Functional relationships of Srb10-Srb11 kinase, carboxy-terminal domain kinase CTDK-I, and transcriptional corepressor Ssn6-Tup1. *Mol Cell Biol* 18(3):1163-71.

Kumar, N., D. Liu, H. Wang, J. Robidoux and S. Collins 2008 Orphan nuclear receptor NOR-1 enhances 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent uncoupling protein-1 gene transcription. *Mol Endocrinol* 22(5):1057-64.

Labelle, Y., J. Zucman, G. Stenman, L. G. Kindblom, J. Knight, C. Turc-Carel, B. Dockhorn-Dworniczak, N. Mandahl, C. Desmaze, M. Peter and et al. 1995 Oncogenic conversion of a novel orphan nuclear receptor by chromosome translocation. *Hum Mol Genet* 4(12):2219-26.

Lambrecht, B. N. 2006 Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24(4):366-8.

LaPorte, S. L., Z. S. Juo, J. Vaclavikova, L. A. Colf, X. Qi, N. M. Heller, A. D. Keegan and K. C. Garcia 2008 Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 132(2):259-72.

Larabee, J. L., S. M. Shakir, S. Barua and J. D. Ballard 2013 Increased cAMP in monocytes augments Notch signaling mechanisms by elevating RBP-J and transducin-like enhancer of Split (TLE). *J Biol Chem* 288(30):21526-36.

Laudet, V. 1997 Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* 19(3):207-26.

Law, S. W., O. M. Conneely, F. J. DeMayo and B. W. O'Malley 1992 Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6(12):2129-35.

Lee, C. G., R. J. Homer, Z. Zhu, S. Lanone, X. Wang, V. Koteliansky, J. M. Shipley, P. Gotwals, P. Noble, Q. Chen, R. M. Senior and J. A. Elias 2001 Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194(6):809-21.

Lee, C. H., P. Olson and R. M. Evans 2003 Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144(6):2201-7.

Lee, W., B. C. Andrews, M. Faust, U. Walldorf and E. M. Verheyen 2009 Hipk is an essential protein that promotes Notch signal transduction in the *Drosophila* eye by inhibition of the global co-repressor Groucho. *Dev Biol* 325(1):263-72.

Leskinen, M. J., P. T. Kovanen and K. A. Lindstedt 2003 Regulation of smooth muscle cell growth, function and death in vitro by activated mast cells--a potential mechanism for the weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochem Pharmacol* 66(8):1493-8.

Levanon, D., D. Bettoun, C. Harris-Cerruti, E. Woolf, V. Negreanu, R. Eilam, Y. Bernstein, D. Goldenberg, C. Xiao, M. Fliegau, E. Kremer, F. Otto, O. Brenner, A. Lev-Tov and Y. Groner 2002 The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *Embo J* 21(13):3454-63.

Levanon, D., R. E. Goldstein, Y. Bernstein, H. Tang, D. Goldenberg, S. Stifani, Z. Paroush and Y. Groner 1998 Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20):11590-5.

Li, H., M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Jr. and P. Libby 1993 An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13(2):197-204.

Li, H., S. K. Kolluri, J. Gu, M. I. Dawson, X. Cao, P. D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J. A. Fontana, J. C. Reed and X. Zhang 2000 Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289(5482):1159-64.

Li, S. S. 2000 Structure and function of the Groucho gene family and encoded transcriptional corepressor proteins from human, mouse, rat, Xenopus, Drosophila and nematode. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 24(2):47-55.

Liao, X., N. Sharma, F. Kapadia, G. Zhou, Y. Lu, H. Hong, K. Paruchuri, G. H. Mahabeleshwar, E. Dalmas, N. Venteclef, C. A. Flask, J. Kim, B. W. Doreian, K. Q. Lu, K. H. Kaestner, A. Hamik, K. Clement and M. K. Jain 2011 Kruppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest* 121(7):2736-49.

Libby, P. 2002 Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917):868-874.

Libby, P., M. Aikawa and U. Schonbeck 2000 Cholesterol and atherosclerosis. *Biochimica Biophysica Acta* 1529(1-3):299-309.

Lijnen, H. R. 2001 Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 86(1):324-33.

Lin, Y., X. Zhu, F. L. McLntee, H. Xiao, J. Zhang, M. Fu and Y. E. Chen 2004 Interferon regulatory factor-1 mediates PPARgamma-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2):257-263.

Linderson, Y., D. Eberhard, S. Malin, A. Johansson, M. Busslinger and S. Pettersson 2004 Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO Rep* 5(3):291-6.

Liu, D., H. Jia, D. I. Holmes, A. Stannard and I. Zachary 2003 Vascular endothelial growth factor-regulated gene expression in endothelial cells: KDR-mediated induction of Egr3 and the related nuclear receptors Nur77, Nurr1, and Nor1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(11):2002-7.

Liu, G., A. Friggeri, Y. Yang, Y. J. Park, Y. Tsuruta and E. Abraham 2009 miR-147, a microRNA that is induced upon Toll-like receptor stimulation, regulates murine macrophage inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(37):15819-24.

Liu, M. H., J. Li, P. Shen, B. Husna, E. S. Tai and E. L. Yong 2008 A natural polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha hinge region attenuates transcription due to defective release of nuclear receptor corepressor from chromatin. *Mol Endocrinol* 22(5):1078-92.

Liu, Q., X. Zhu, L. Xu, Y. Fu and W. T. Garvey 2013 6-Mercaptopurine augments glucose transport activity in skeletal muscle cells in part via a mechanism dependent upon orphan nuclear receptor NR4A3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(9):E1081-92.

- Liu, Y., G. Dehni, K. J. Purcell, J. Sokolow, M. L. Carcangiu, S. Artavanis-Tsakonas and S. Stifani 1996 Epithelial expression and chromosomal location of human TLE genes: implications for notch signaling and neoplasia. *Genomics* 31(1):58-64.
- Loftus, I. M., A. R. Naylor, P. R. Bell and M. M. Thompson 2002 Matrix metalloproteinases and atherosclerotic plaque instability. *Br J Surg* 89(6):680-94.
- Love, D. C. and J. A. Hanover 2005 The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005(312):re13.
- Lu, J., R. Webb, J. A. Richardson and E. N. Olson 1999 MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2):552-7.
- Lumeng, C. N., S. M. Deyoung, J. L. Bodzin and A. R. Saltiel 2007 Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56(1):16-23.
- Lundequist, A., G. Calounova, H. Wensman, E. Ronnberg and G. Pejler 2011 Differential regulation of Nr4a subfamily nuclear receptors following mast cell activation. *Mol Immunol* 48(15-16):1753-61.
- Lusis, A. J. 2000 Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
- Ma, H., W. Zhong, Y. Jiang, C. Fontaine, S. Li, J. Fu, V. M. Olkkonen, B. Staels and D. Yan 2013 Increased atherosclerotic lesions in LDL receptor deficient mice with hematopoietic nuclear receptor Rev-erbalpha knock- down. *J Am Heart Assoc* 2(4):e000235.
- Maira, M., C. Martens, A. Philips and J. Drouin 1999 Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19(11):7549-57.
- Malik, S. and R. G. Roeder 2010 The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat Rev Genet* 11(11):761-72.

Mallat, Z., A. Gojova, V. Brun, B. Esposito, N. Fournier, F. Cottrez, A. Tedgui and H. Groux 2003 Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 108(10):1232-7.

Mallat, Z., S. Taleb, H. Ait-Oufella and A. Tedgui 2009 The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl:S364-9.

Mallo, M., F. Franco del Amo and T. Gridley 1993 Cloning and developmental expression of Grg, a mouse gene related to the groucho transcript of the Drosophila Enhancer of split complex. *Mech Dev* 42(1-2):67-76.

Manning-Tobin, J. J., K. J. Moore, T. A. Seimon, S. A. Bell, M. Sharuk, J. I. Alvarez-Leite, M. P. de Winther, I. Tabas and M. W. Freeman 2009 Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(1):19-26.

Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, S. Sozzani and L. Ruco 1992 The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13(7):265-70.

Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon 2011 Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11(8):519-31.

Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena and A. Sica 2002 Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11):549-55.

Marcál, N., H. Patel, Z. Dong, S. Belanger-Jasmin, B. Hoffman, C. D. Helgason, J. Dang and S. Stifani 2005 Antagonistic effects of Grg6 and Groucho/TLE on the transcription repression activity of brain factor 1/FoxG1 and cortical neuron differentiation. *Mol Cell Biol* 25(24):10916-29.

Martinez, F. O., S. Gordon, M. Locati and A. Mantovani 2006 Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177(10):7303-11.

Martinez, F. O., L. Helming, R. Milde, A. Varin, B. N. Melgert, C. Draijer, B. Thomas, M. Fabbri, A. Crawshaw, L. P. Ho, N. H. Ten Hacken, V. Cobos Jimenez, N. A. Kootstra, J. Hamann, D. R. Greaves, M. Locati, A. Mantovani and S. Gordon 2013 Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121(9):e57-69.

Martinez-Gonzalez, J., J. Rius, A. Castello, C. Cases-Langhoff and L. Badimon 2003 Neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) modulates vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 92(1):96-103.

Maruyama, K., T. Tsukada, N. Ohkura, S. Bandoh, T. Hosono and K. Yamaguchi 1998 The NGFI-B subfamily of the nuclear receptor superfamily (review). *Int J Oncol* 12(6):1237-43.

Maxwell, M. A. and G. E. Muscat 2006 The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002.

Mayi, T. H., M. Daoudi, B. Derudas, B. Gross, G. Bories, K. Wouters, J. Brozek, R. Caiazzo, V. Raverdi, M. Pigeyre, P. Allavena, A. Mantovani, F. Pattou, B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi 2012 Human adipose tissue macrophages display activation of cancer-related pathways. *J Biol Chem* 287(26):21904-13.

McCarthy, C., M. M. Duffy, D. Mooney, W. G. James, M. D. Griffin, D. J. Fitzgerald and O. Belton 2013 IL-10 mediates the immunoregulatory response in conjugated linoleic acid-induced regression of atherosclerosis. *Faseb J* 27(2):499-510.

McEvoy, J. P., J. M. Meyer, D. C. Goff, H. A. Nasrallah, S. M. Davis, L. Sullivan, H. Y. Meltzer, J. Hsiao, T. Scott Stroup and J. A. Lieberman 2005 Prevalence of the metabolic syndrome in patients with schizophrenia: baseline results from the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) schizophrenia trial and comparison with national estimates from NHANES III. *Schizophr Res* 80(1):19-32.

McKenna, N. J., J. Xu, Z. Nawaz, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley 1999 Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6):3-12.

Mebius, R. E. and G. Kraal 2005 Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5(8):606-16.

Mehta, J. L. 2004 The role of LOX-1, a novel lectin-like receptor for oxidized low density lipoprotein, in atherosclerosis. *Can J Cardiol* 20 Suppl B:32B-36B.

Merad, M., F. Ginhoux and M. Collin 2008 Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8(12):935-47.

Mercalli, A., I. Calavita, E. Dugnani, A. Citro, E. Cantarelli, R. Nano, R. Melzi, P. Maffi, A. Secchi, V. Sordi and L. Piemonti 2013 Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. *Immunology* 140(2):179-90.

Metzger, D. E., M. Gasperowicz, F. Otto, J. C. Cross, G. Gradwohl and K. S. Zaret 2012 The transcriptional co-repressor Grg3/Tle3 promotes pancreatic endocrine progenitor delamination and beta-cell differentiation. *Development* 139(8):1447-56.

Metzger, D. E., C. Liu, A. S. Ziaie, A. Naji and K. S. Zaret 2014 Grg3/TLE3 and Grg1/TLE1 induce monohormonal pancreatic beta-cells while repressing alpha-cell functions. *Diabetes* 63(5):1804-16.

Milbrandt, J. 1988 Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1(3):183-8.

Milili, M., L. Gauthier, J. Veran, M. G. Mattei and C. Schiff 2002 A new Groucho TLE4 protein may regulate the repressive activity of Pax5 in human B lymphocytes. *Immunology* 106(4):447-55.

Miller, N. E. and G. J. Miller 1975 Letter: High-density lipoprotein and atherosclerosis. *Lancet* 1(7914):1033.

Mor, A., D. Planer, G. Luboshits, A. Afek, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, G. Keren and J. George 2007 Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(4):893-900.

Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii and S. Koyasu 2010 Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463(7280):540-4.

Mosser, D. M. and J. P. Edwards 2008 Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-69.

Muhr, J., E. Andersson, M. Persson, T. M. Jessell and J. Ericson 2001 Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104(6):861-73.

Mukundan, L., J. I. Odegaard, C. R. Morel, J. E. Heredia, J. W. Mwangi, R. R. Ricardo-Gonzalez, Y. P. Goh, A. R. Eagle, S. E. Dunn, J. U. Awakuni, K. D. Nguyen, L. Steinman, S. A. Michie and A. Chawla 2009 PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 15(11):1266-72.

Munitz, A., A. Waddell, L. Seidu, E. T. Cole, R. Ahrens, S. P. Hogan and M. E. Rothenberg, 2008 Resistin-like molecule alpha enhances myeloid cell activation and promotes colitis. *J Allergy Clin Immunol* 122(6):1200-1207 e1.

Nagy, E., J. W. Eaton, V. Jeney, M. P. Soares, Z. Varga, Z. Galajda, J. Szentmiklosi, G. Mehes, T. Csonka, A. Smith, G. M. Vercellotti, G. Balla and J. Balla 2010 Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(7):1347-53.

Nahrendorf, M., F. K. Swirski, E. Aikawa, L. Stangenberg, T. Wurdinger, J. L. Figueiredo, P. Libby, R. Weissleder and M. J. Pittet 2007 The healing myocardium sequentially mobilizes

two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 204(12):3037-47.

Nakshatri, H. and P. Bhat-Nakshatri 1998 Multiple parameters determine the specificity of transcriptional response by nuclear receptors HNF, ARP-1, PPAR, RAR and RXR through common response elements. *Nucleic Acids Research* 26:16114-16121.

Nazari-Jahantigh, M., Y. Wei, H. Noels, S. Akhtar, Z. Zhou, R. R. Koenen, K. Heyll, F. Gremse, F. Kiessling, J. Grommes, C. Weber and A. Schober 2012 MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest* 122(11):4190-202.

Neill, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin and A. N. McKenzie 2010 Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464(7293):1367-70.

Newby, A. C. 1997 Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions. *Coron Artery Dis* 8(3-4):213-24.

Newsholme, P., L. F. Costa Rosa, E. A. Newsholme and R. Curi 1996 The importance of fuel metabolism to macrophage function. *Cell Biochem Funct* 14(1):1-10.

Newsholme, P., S. Gordon and E. A. Newsholme 1987 Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem J* 242(3):631-6.

Nielsen, M. J., H. J. Moller and S. K. Moestrup 2010 Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxid Redox Signal* 12(2):261-73.

Nielsen, R., T. A. Pedersen, D. Hagenbeek, P. Moulos, R. Siersbaek, E. Megens, S. Denissov, M. Borgesen, K. J. Francoijs, S. Mandrup and H. G. Stunnenberg
2008 Genome-wide profiling of PPARgamma:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes Dev* 22(21):2953-67.

Noel, W., G. Hassanzadeh, G. Raes, B. Namangala, I. Daems, L. Brys, F. Brombacher, P. D. Baetselier and A. Beschin 2002 Infection stage-dependent modulation of macrophage activation in *Trypanosoma congolense*-resistant and -susceptible mice. *Infect Immun* 70(11):6180-7.

Nomiyama, T., Y. Zhao, F. Gizard, H. M. Findeisen, E. B. Heywood, K. L. Jones, O. M. Conneely and D. Bruemmer 2009 Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury. *Circulation* 119(4):577-86.

Nonogaki, K., T. Kaji, Y. Ohba, M. Sumii, M. Wakameda and T. Tamari 2009 Serotonin 5-HT_{2C} receptor-independent expression of hypothalamic NOR1, a novel modulator of food intake and energy balance, in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 386(2):311-5.

Nuthall, H. N., J. Husain, K. W. McLarren and S. Stifani 2002 Role for Hes1-induced phosphorylation in Groucho-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 22(2):389-99.

Nuthall, H. N., K. Joachim, A. Palaparti and S. Stifani 2002 A role for cell cycle-regulated phosphorylation in Groucho-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem* 277(52):51049-57.

Nuthall, H. N., K. Joachim and S. Stifani 2004 Phosphorylation of serine 239 of Groucho/TLE1 by protein kinase CK2 is important for inhibition of neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 24(19):8395-407.

Odegaard, J. I. and A. Chawla 2011 Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol* 6:275-97.

Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, A. Red Eagle, D. Vats, C. R. Morel, M. H. Goforth, V. Subramanian, L. Mukundan, A. W. Ferrante and A. Chawla 2008 Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR δ ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 7(6):496-507.

Ohkura, N., M. Hijikuro and K. Miki 1996 Antisense oligonucleotide to NOR-1, a novel orphan nuclear receptor, induces migration and neurite extension of cultured forebrain cells. *Brain Res Mol Brain Res* 35(1-2):309-13.

Ohkura, N., M. Hijikuro, A. Yamamoto and K. Miki 1994 Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 205(3):1959-65.

Ohkura, N., T. Hosono, K. Maruyama, T. Tsukada and K. Yamaguchi 1999 An isoform of Nurr1 functions as a negative inhibitor of the NGFI-B family signaling. *Biochim Biophys Acta* 1444(1):69-79.

Ohkura, N., M. Ito, T. Tsukada, K. Sasaki, K. Yamaguchi and K. Miki 1996 Structure, mapping and expression of a human NOR-1 gene, the third member of the Nur77/NGFI-B family. *Biochim Biophys Acta* 1308(3):205-14.

Ohkura, N., M. Ito, T. Tsukada, K. Sasaki, K. Yamaguchi and K. Miki 1998 Alternative splicing generates isoforms of human neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) mRNA. *Gene* 211(1):79-85.

Oita, R. C., D. J. Mazzatti, F. L. Lim, J. R. Powell and B. J. Merry 2009 Whole-genome microarray analysis identifies up-regulation of Nr4a nuclear receptors in muscle and liver from diet-restricted rats. *Mech Ageing Dev* 130(4):240-7.

Palaparti, A., A. Baratz and S. Stifani 1997 The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *J Biol Chem* 272(42):26604-10.

Parkhurst, S. M. 1998 Groucho: making its Marx as a transcriptional co-repressor. *Trends Genet* 14(4):130-2.

Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass 2005 A SUMOylation-dependent pathway

mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437(7059):759-63.

Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock 1989 Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74(7):2527-34.

Pearen, M. A., N. A. Eriksson, R. L. Fitzsimmons, J. M. Goode, N. Martel, S. Andrikopoulos and G. E. Muscat 2012 The nuclear receptor, Nor-1, markedly increases type II oxidative muscle fibers and resistance to fatigue. *Mol Endocrinol* 26(3):372-84.

Pearen, M. A., J. G. Ryall, M. A. Maxwell, N. Ohkura, G. S. Lynch and G. E. Muscat 2006 The orphan nuclear receptor, NOR-1, is a target of beta-adrenergic signaling in skeletal muscle. *Endocrinology* 147(11):5217-27.

Pei, L., A. Castrillo, M. Chen, A. Hoffmann and P. Tontonoz 2005 Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 280(32):29256-62.

Pei, L., A. Castrillo and P. Tontonoz 2006 Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 20(4):786-94.

Pei, L., H. Waki, B. Vaitheesvaran, D. C. Wilpitz, I. J. Kurland and P. Tontonoz 2006 NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat Med* 12(9):1048-55.

Pekarsky, Y., C. Hallas, A. Palamarchuk, A. Koval, F. Bullrich, Y. Hirata, R. Bichi, J. Letofsky and C. M. Croce 2001 Akt phosphorylates and regulates the orphan nuclear receptor Nur77. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3690-4.

Pellizzari, L., A. D'Elia, A. Rustighi, G. Manfioletti, G. Tell and G. Damante 2000 Expression and function of the homeodomain-containing protein Hex in thyroid cells. *Nucleic Acids Res* 28(13):2503-11.

Perissi, V., L. M. Staszewski, E. M. McInerney, R. Kurokawa, A. Kronen, D. W. Rose, M. H. Lambert, M. V. Milburn, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld 1999 Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13(24):3198-208.

Petropoulos, I., D. Part, A. Ochoa, M. M. Zakin and E. Lamas 1995 NOR-2 (neuron-derived orphan receptor), a brain zinc finger protein, is highly induced during liver regeneration. *FEBS Lett* 372(2-3):273-8.

Philips, A., S. Lesage, R. Gingras, M. H. Maira, Y. Gauthier, P. Hugo and J. Drouin 1997 Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17(10):5946-51.

Pickles, L. M., S. M. Roe, E. J. Hemingway, S. Stifani and L. H. Pearl 2002 Crystal structure of the C-terminal WD40 repeat domain of the human Groucho/TLE1 transcriptional corepressor. *Structure* 10(6):751-61.

Pitsilos, S., J. Hunt, E. R. Mohler, A. M. Prabhakar, M. Poncz, J. Dawicki, T. Z. Khalapyan, M. L. Wolfe, R. Fairman, M. Mitchell, J. Carpenter, M. A. Golden, D. B. Cines and B. S. Sachais 2003 Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 90(6):1112-20.

Plenz, G., S. Reichenberg, C. Koenig, J. Rauterberg, M. C. Deng, H. A. Baba and H. Robenek 1999 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(7):1658-68.

Prussin, C. and D. D. Metcalfe 2006 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117(2 Suppl Mini-Primer):S450-6.

Qing, H., Y. Liu, Y. Zhao, J. Aono, K. L. Jones, E. B. Heywood, D. Howatt, C. M. Binkley, A. Daugherty, Y. Liang and D. Bruemmer 2014 Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 in hematopoietic stem cells accelerates atherosclerosis. *Stem Cells* 32(9):2419-29.

Quinn, C. M., W. Jessup, J. Wong, L. Kritharides and A. J. Brown 2005 Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem J* 385(Pt 3):823-30.

Raines, E. W. and N. Ferri 2005 Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res* 46(6):1081-92.

Rastinejad, F., T. Perlmann, R. M. Evans and P. B. Sigler 1995 Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375(6528):203-11.

Ray, A. and K. E. Prefontaine 1994 Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(2):752-6.

Red Eagle, A. and A. Chawla 2010 In obesity and weight loss, all roads lead to the mighty macrophage. *J Clin Invest* 120(10):3437-40.

Redd, M. J., M. B. Arnaud and A. D. Johnson 1997A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription in vitro. *J Biol Chem* 272(17):11193-7.

Reese, T. A., H. E. Liang, A. M. Tager, A. D. Luster, N. Van Rooijen, D. Voehringer and R. M. Locksley 2007 Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447(7140):92-6.

Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willsson, C. J. Kelly and C. K. Glass 1998 The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82.

Ricquier, D. and F. Bouillaud 2000 The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345 Pt 2:161-79.

Rigamonti, E., L. Helin, S. Lestavel, A. L. Mutka, M. Lepore, C. Fontaine, M. A. Bouhrel, S. Bultel, J. C. Fruchart, E. Ikonen, V. Clavey, B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi 2005 Liver

X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ Res* 97(7):682-9.

Rius, J., J. Martinez-Gonzalez, J. Crespo and L. Badimon 2004 Involvement of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) in LDL-induced mitogenic stimulus in vascular smooth muscle cells: role of CREB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(4):697-702.

Robinson-Rechavi, M., H. Escriva Garcia and V. Laudet 2003 The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116(Pt 4):585-6.

Rochette-Egly, C. 2003 Nuclear receptors: integration of multiple signalling pathways through phosphorylation. *Cell Signal* 15(4):355-66.

Rodriguez-Calvo, R., A. Guadall, O. Calvayrac, M. A. Navarro, J. Alonso, B. Ferran, A. de Diego, P. Muniesa, J. Osada, C. Rodriguez and J. Martinez-Gonzalez 2013 Over-expression of neuron-derived orphan receptor-1 (NOR-1) exacerbates neointimal hyperplasia after vascular injury. *Hum Mol Genet* 22(10):1949-59.

Rodriguez-Prados, J. C., P. G. Traves, J. Cuenca, D. Rico, J. Aragonés, P. Martín-Sanz, M. Cascante and L. Bosca 2010 Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation. *J Immunol* 185(1):605-14.

Rorive, S., C. Maris, O. Debeir, F. Sandras, M. Vidaud, I. Bieche, I. Salmon and C. Decaestecker 2006 Exploring the distinctive biological characteristics of pilocytic and low-grade diffuse astrocytomas using microarray gene expression profiles. *J Neuropathol Exp Neurol* 65(8):794-807.

Rosa, L. F., Y. Cury and R. Curi 1992 Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in rat macrophages. *J Endocrinol* 135(2):213-9.

Rosenfeld, M. G. and C. K. Glass 2001 Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 276(40):36865-8.

Rosenson, R. S., H. B. Brewer, Jr., W. S. Davidson, Z. A. Fayad, V. Fuster, J. Goldstein, M. Hellerstein, X. C. Jiang, M. C. Phillips, D. J. Rader, A. T. Remaley, G. H. Rothblat, A. R. Tall and L. Yvan-Charvet 2012 Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* 125(15):1905-19.

Ross, R. 1993 The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809.

Ross, R. 1999 Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 340:115-126.

Rot, A. and U. H. von Andrian 2004 Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928.

Ruse, M. D., Jr., M. L. Privalsky and F. M. Sladek 2002 Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1: modulation by the F domain. *Mol Cell Biol* 22(6):1626-38.

Saijo, K., B. Winner, C. T. Carson, J. G. Collier, L. Boyer, M. G. Rosenfeld, F. H. Gage and C. K. Glass 2009 A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137(1):47-59.

Sanguedolce, M. V., B. P. Leblanc, J. L. Betz and H. G. Stunnenberg 1997 The promoter context is a decisive factor in establishing selective responsiveness to nuclear class II receptors. *Embo J* 16(10):2861-73.

Sanson, M., E. Distel and E. A. Fisher 2013 HDL induces the expression of the M2 macrophage markers arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-dependent process. *PLoS One* 8(8):e74676.

Santner, A. and M. Estelle 2010 The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* 61(6):1029-40.

Sasai, Y., R. Kageyama, Y. Tagawa, R. Shigemoto and S. Nakanishi 1992 Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to *Drosophila* hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6(12B):2620-34.

Sawyer, R. T. 1986 The significance of local resident pulmonary alveolar macrophage proliferation to population renewal. *J Leukoc Biol* 39(1):77-87.

Scarce, L. M., T. M. Laz, T. G. Hazel, L. F. Lau and R. Taub 1993 RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nur77 family that is rapidly induced in regenerating liver. *J Biol Chem* 268(12):8855-61.

Schule, R., P. Rangarajan, N. Yang, S. Kliewer, L. J. Ransone, J. Bolado, I. M. Verma and R. M. Evans 1991 Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14):6092-6.

Sekiya, M., J. Osuga, M. Igarashi, H. Okazaki and S. Ishibashi 2011 The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *J Atheroscler Thromb* 18(5):359-64.

Sekiya, T. and K. S. Zaret 2007 Repression by Groucho/TLE/Grg proteins: genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo. *Mol Cell* 28(2):291-303.

Seo, S. W., H. Lee, H. I. Lee and H. S. Kim 2011 The role of TLE1 in synovial sarcoma. *J Orthop Res* 29(7):1131-6.

Shaikh, S., J. Brittenden, R. Lahiri, P. A. Brown, F. Thies and H. M. Wilson 2012 Macrophage subtypes in symptomatic carotid artery and femoral artery plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 44(5):491-7.

Shemshedini, L., R. Knauthe, P. Sassone-Corsi, A. Pornon and H. Gronemeyer 1991 Cell-specific inhibitory and stimulatory effects of Fos and Jun on transcription activation by nuclear receptors. *Embo J* 10(12):3839-49.

Shipp, M. A., K. N. Ross, P. Tamayo, A. P. Weng, J. L. Kutok, R. C. Aguiar, M. Gaasenbeek, M. Angelo, M. Reich, G. S. Pinkus, T. S. Ray, M. A. Koval, K. W. Last, A. Norton, T. A. Lister, J. Mesirov, D. S. Neuberg, E. S. Lander, J. C. Aster and T. R. Golub 2002 Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8(1):68-74.

Sica, A. and V. Bronte 2007 Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest* 117(5):1155-66.

Signer, R. A., E. Montecino-Rodriguez and K. Dorshkind 2007 Aging, B lymphopoiesis, and patterns of leukemogenesis. *Exp Gerontol* 42(5):391-5.

Simon, L. M., S. G. Axline, B. R. Horn and E. D. Robin 1973 Adaptations of energy metabolism in the cultivated macrophage. *J Exp Med* 138(6):1413-25.

Siracusa, M. C., J. G. Perrigoue, M. R. Comeau and D. Artis 2010 New paradigms in basophil development, regulation and function. *Immunol Cell Biol* 88(3):275-84.

Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulten, O. Wiklund, T. L. Innerarity and J. Boren 2002 Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417(6890):750-4.

Skrzeczynska-Moncznik, J., M. Bzowska, S. Loseke, E. Grage-Griebenow, M. Zembala and J. Pryjma 2008 Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67(2):152-9.

Sladek, F. M., M. D. Ruse, Jr., L. Nepomuceno, S. M. Huang and M. R. Stallcup 1999 Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 α 1. *Mol Cell Biol* 19(10):6509-22.

Soehnlein, O., M. Drechsler, Y. Doring, D. Lievens, H. Hartwig, K. Kemmerich, A. Ortega-Gomez, M. Mandl, S. Vijayan, D. Projahn, C. D. Garlachs, R. R. Koenen, M. Hristov, E. Lutgens, A. Zernecke and C. Weber 2013 Distinct functions of chemokine receptor axes in

the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med* 5(3):471-81.

Sohn, Y. C., E. Kwak, Y. Na, J. W. Lee and S. K. Lee 2001 Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors and activating signal cointegrator-2 as transcriptional coregulators of the orphan nuclear receptor Nur77. *J Biol Chem* 276(47):43734-9.

Song, H., P. Hasson, Z. Paroush and A. J. Courey 2004 Groucho oligomerization is required for repression in vivo. *Mol Cell Biol* 24(10):4341-50.

Sottero, B., P. Gamba, M. Longhi, F. Robbesyn, P. M. Abuja, R. J. Schaur, G. Poli and G. Leonarduzzi 2005 Expression and synthesis of TGFbeta1 is induced in macrophages by 9-oxononanoyl cholesterol, a major cholesteryl ester oxidation product. *Biofactors* 24(1-4):209-16.

Spring, J. 1997 Vertebrate evolution by interspecific hybridisation--are we polyploid? *FEBS Lett* 400(1):2-8.

Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler 1995 A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(9):1512-31.

Stewart, L. and S. Stifani 2005 Dendritic localization of the transcriptional co-repressor Groucho/TLE1 in cortical and cerebellar neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 140(1-2):106-10.

Stifani, S., C. M. Blaumueller, N. J. Redhead, R. E. Hill and S. Artavanis-Tsakonas 1992 Human homologs of a Drosophila Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* 2(4):343.

Stoger, J. L., M. J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C. M. van der Loos, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens and M. P. de Winther 2012 Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225(2):461-8.

Strong, J. P., G. T. Malcom and M. C. Oalman 1995 Environmental and genetic risk factors in early human atherogenesis: lessons from the PDAY study. *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. Pathol Int* 45(6):403-8.

Sukhova, G. K., U. Schonbeck, E. Rabkin, F. J. Schoen, A. R. Poole, R. C. Billingham and P. Libby 1999 Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation* 99(19):2503-9.

Sun, Z., X. Cao, M. M. Jiang, Y. Qiu, H. Zhou, L. Chen, B. Qin, H. Wu, F. Jiang, J. Chen, J. Liu, Y. Dai, H. F. Chen, Q. Y. Hu, Z. Wu, J. Z. Zeng, X. S. Yao and X. K. Zhang 2012 Inhibition of beta-catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene* 31(21):2653-67.

Sunderkotter, C., T. Nikolic, M. J. Dillon, N. Van Rooijen, M. Stehling, D. A. Drevets and P. J. Leenen 2004 Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172(7):4410-7.

Swingler, T. E., K. L. Bess, J. Yao, S. Stifani and P. S. Jayaraman 2004 The proline-rich homeodomain protein recruits members of the Groucho/Transducin-like enhancer of split protein family to co-repress transcription in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 279(33):34938-47.

Sykes, D. B., J. Scheele, M. Pasillas and M. P. Kamps 2003 Transcriptional profiling during the early differentiation of granulocyte and monocyte progenitors controlled by conditional versions of the E2a-Pbx1 oncoprotein. *Leuk Lymphoma* 44(7):1187-99.

Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht and G. J. Randolph 2007 Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117(1):185-94.

Tall, A. R., P. Costet and N. Wang 2002 Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* 110(7):899-904.

Tedgui, A. and Z. Mallat 2006 Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86(2):515-81.

Tedgui, A., A. Mamontova, S. Séguret-Macé, T. Grötzinger, N. Vu-Dac, K. Schoonjans, P. De Vos, P. Gervois, B. Esposito, C. Chanial, J.-C. Fruchart, N. Delhay-Bouchaud, J. Auwerx, N. Duverger, J. Mariani and B. Staels 1997 Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in *staggerer* mouse: evidence for ROR α as a regulator of intestinal apo A-I gene transcription. *Nature Med.* submitted.

Terry, J., T. Saito, S. Subramanian, C. Ruttan, C. R. Antonescu, J. R. Goldblum, E. Downs-Kelly, C. L. Corless, B. P. Rubin, M. van de Rijn, M. Ladanyi and T. O. Nielsen 2007 TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies. *Am J Surg Pathol* 31(2):240-6.

Tessem, J. S., L. G. Moss, L. C. Chao, M. Arlotto, D. Lu, M. V. Jensen, S. B. Stephens, P. Tontonoz, H. E. Hohmeier and C. B. Newgard 2014 Nkx6.1 regulates islet beta-cell proliferation via Nr4a1 and Nr4a3 nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(14):5242-7.

Tetsuka, T., H. Uranishi, H. Imai, T. Ono, S. Sonta, N. Takahashi, K. Asamitsu and T. Okamoto 2000 Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J Biol Chem* 275(6):4383-90.

Thompson, R. W., D. R. Holmes, R. A. Mertens, S. Liao, M. D. Botney, R. P. Mecham, H. G. Welgus and W. C. Parks 1995 Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest* 96(1):318-26.

Tolkunova, E. N., M. Fujioka, M. Kobayashi, D. Deka and J. B. Jaynes 1998 Two distinct types of repression domain in engrailed: one interacts with the groucho corepressor and is preferentially active on integrated target genes. *Mol Cell Biol* 18(5):2804-14.

Traves, P. G., P. de Atauri, S. Marin, M. Pimentel-Santillana, J. C. Rodriguez-Prados, I. Marin de Mas, V. A. Selivanov, P. Martin-Sanz, L. Bosca and M. Cascante 2012 Relevance of the MEK/ERK signaling pathway in the metabolism of activated macrophages: a metabolomic approach. *J Immunol* 188(3):1402-10.

Ueno, T., M. Toi, H. Saji, M. Muta, H. Bando, K. Kuroi, M. Koike, H. Inadera and K. Matsushima 2000 Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 6(8):3282-9.

Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson and R. M. Evans 1991 Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 65(7):1255-66.

Vacca, M., S. Murzilli, L. Salvatore, G. Di Tullio, A. D'Orazio, G. Lo Sasso, G. Graziano, M. Pinzani, M. Chieppa, R. Mariani-Costantini, G. Palasciano and A. Moschetta 2013 Neuron-derived orphan receptor 1 promotes proliferation of quiescent hepatocytes. *Gastroenterology* 144(7):1518-1529 e3.

Van Dyken, S. J. and R. M. Locksley 2013 Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* 31:317-43.

Varanasi, U. S., M. Klis, P. B. Mikesell and R. J. Trumbly 1996 The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol Cell Biol* 16(12):6707-14.

Varol, C., L. Landsman, D. K. Fogg, L. Greenshtein, B. Gildor, R. Margalit, V. Kalchenko, F. Geissmann and S. Jung 2007 Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med* 204(1):171-80.

Verreck, F. A., T. de Boer, D. M. Langenberg, M. A. Hoeve, M. Kramer, E. Vaisberg, R. Kastelein, A. Kolk, R. de Waal-Malefyt and T. H. Ottenhoff 2004 Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(13):4560-5.

Villanueva, C. J., H. Waki, C. Godio, R. Nielsen, W. L. Chou, L. Vargas, K. Wroblewski, C. Schmedt, L. C. Chao, R. Boyadjian, S. Mandrup, A. Hevener, E. Saez and P. Tontonoz 2011 TLE3 is a dual-function transcriptional coregulator of adipogenesis. *Cell Metab* 13(4):413-27.

Vinayavekhin, N. and A. Saghatelian 2011 Discovery of a protein-metabolite interaction between unsaturated fatty acids and the nuclear receptor Nur77 using a metabolomics approach. *J Am Chem Soc* 133(43):17168-71.

Voehringer, D., T. A. Reese, X. Huang, K. Shinkai and R. M. Locksley 2006 Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 203(6):1435-46.

Wagner, B. L., A. F. Valledor, G. Shao, C. L. Daige, E. D. Bischoff, M. Petrowski, K. Jepsen, S. H. Baek, R. A. Heyman, M. G. Rosenfeld, I. G. Schulman and C. K. Glass 200 Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol* 23(16):5780-9.

Wahi, M. and A. D. Johnson 1995 Identification of genes required for alpha 2 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 140(1):79-90.

Walther, M., J. Woodruff, F. Edele, D. Jeffries, J. E. Tongren, E. King, L. Andrews, P. Bejon, S. C. Gilbert, J. B. De Souza, R. Sinden, A. V. Hill and E. M. Riley 2006 Innate immune responses to human malaria: heterogeneous cytokine responses to blood-stage *Plasmodium falciparum* correlate with parasitological and clinical outcomes. *J Immunol* 177(8):5736-45.

Wang, Z., G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P. Walker and T. Perlmann 2003 Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423(6939):555-60.

Wansa, K. D., J. M. Harris and G. E. Muscat 2002 The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *J Biol Chem* 277(36):33001-11.

Wansa, K. D., J. M. Harris, G. Yan, P. Ordentlich and G. E. Muscat 2003 The AF-1 domain of the orphan nuclear receptor NOR-1 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-mercaptopurine. *J Biol Chem* 278(27):24776-90.

Wansa, K. D. and G. E. Muscat 2005 TRAP220 is modulated by the antineoplastic agent 6-Mercaptopurine, and mediates the activation of the NR4A subgroup of nuclear receptors. *J Mol Endocrinol* 34(3):835-48.

Wasserman, E. J. and N. M. Shipley 2006 Atherothrombosis in acute coronary syndromes: mechanisms, markers, and mediators of vulnerability. *Mt Sinai J Med* 73(1):431-9.

Watanabe, M., A. Sangawa, Y. Sasaki, M. Yamashita, M. Tanaka-Shintani, M. Shintaku and Y. Ishikawa 2007 Distribution of inflammatory cells in adventitia changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery. *J Atheroscler Thromb* 14(6):325-31.

Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12):1796-808.

Willson, T. M., P. J. Brown, D. D. Sternbach and B. R. Henke 2000 The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 43:527-550.

Wilson, H. M., R. N. Barker and L. P. Erwig 2009 Macrophages: promising targets for the treatment of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 7(2):234-43.

Wilson, T. E., T. J. Fahrner, M. Johnston and J. Milbrandt 1991 Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252(5010):1296-300.

Winkler, C. J., A. Ponce and A. J. Courey 2010 Groucho-mediated repression may result from a histone deacetylase-dependent increase in nucleosome density. *PLoS One* 5(4):e10166.

Witztum, J. L. and D. Steinberg 2001 The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 11(3-4):93-102.

Wong, K. L., W. H. Yeap, J. J. Tai, S. M. Ong, T. M. Dang and S. C. Wong 2012 The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 53(1-3):41-57.

Wu, G. Y., C. J. Field and E. B. Marliss 1991 Glucose and glutamine metabolism in rat macrophages: enhanced glycolysis and unaltered glutaminolysis in spontaneously diabetic BB rats. *Biochim Biophys Acta* 1115(2):166-73.

Wu, J., D. B. Bowe, A. Sadlonova, T. R. Whisenhunt, Y. Hu, A. K. Rustgi, Y. Nie, A. J. Paterson and X. Yang 2014 O-GlcNAc transferase is critical for transducin-like enhancer of split (TLE)-mediated repression of canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 289(17):12168-76.

Wu, W. S., Z. X. Xu, R. Ran, F. Meng and K. S. Chang 2002 Promyelocytic leukemia protein PML inhibits Nur77-mediated transcription through specific functional interactions. *Oncogene* 21(24):3925-33.

Xie, W. and R. M. Evans 2001 Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem* 276(41):37739-42.

Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112(12):1821-1830.

Xu, W., N. Schlagwein, A. Roos, T. K. van den Berg, M. R. Daha and C. van Kooten 2007 Human peritoneal macrophages show functional characteristics of M-CSF-driven anti-inflammatory type 2 macrophages. *Eur J Immunol* 37(6):1594-9.

Yang, X., M. Downes, R. T. Yu, A. L. Bookout, W. He, M. Straume, D. J. Mangelsdorf and R. M. Evans 2006 Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. *Cell* 126(4):801-10.

Yang, X. Y., L. H. Wang, T. Chen, D. R. Hodge, J. H. Resau, L. DaSilva and W. L. Farrar 2000 Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 275(7):4541-4544.

Yang-Yen, H. F., J. C. Chambard, Y. L. Sun, T. Smeal, T. J. Schmidt, J. Drouin and M. Karin 1990 Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62(6):1205-15.

Yao, J., Y. Liu, R. Lo, I. Tretjakoff, A. Peterson and S. Stifani 2000 Disrupted development of the cerebral hemispheres in transgenic mice expressing the mammalian Groucho homologue transducin-like-enhancer of split 1 in postmitotic neurons. *Mech Dev* 93(1-2):105-15.

Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guilliams, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung 2013 Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38(1):79-91.

Yoshino, G., T. Hirano and T. Kazumi 2002 Atherogenic lipoproteins and diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 16(1):29-34.

Zagouras, P., S. Stifani, C. M. Blaumueller, M. L. Carcangiu and S. Artavanis-Tsakonas 1995 Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6414-8.

Zechel, C., X. Q. Shen, J. Y. Chen, Z. P. Chen, P. Chambon and H. Gronemeyer 1994 The dimerization interfaces formed between the DNA binding domains of RXR, RAR and TR determine the binding specificity and polarity of the full-length receptors to direct repeats. *Embo J* 13(6):1425-33.

Zeidan, Q. and G. W. Hart 2010 The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci* 123(Pt 1):13-22.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, L. Jansson, B. J. Hoffer, L. Olson and T. Perlmann 1997 Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276(5310):248-50.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson and T. Perlmann 1996 Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10(12):1656-66.

Zeyda, M., D. Farmer, J. Todoric, O. Aszmann, M. Speiser, G. Gyori, G. Zlabinger and T. Stulnig 2007 Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)*. 31(9):1420-1428.

Zhang, X., H. M. Chen, E. Jaramillo, L. Wang and S. R. D'Mello 2008 Histone deacetylase-related protein inhibits AES-mediated neuronal cell death by direct interaction. *J Neurosci Res* 86(11):2423-31.

Zhao, Y. and D. Bruemmer 2010 NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(8):1535-41.

Zhao, Y., D. A. Howatt, F. Gizard, T. Nomiyama, H. M. Findeisen, E. B. Heywood, K. L. Jones, O. M. Conneely, A. Daugherty and D. Bruemmer 2010 Deficiency of the NR4A orphan nuclear receptor NOR1 decreases monocyte adhesion and atherosclerosis. *Circ Res* 107(4):501-11.

Zhou, G., R. Cummings, Y. Li, S. Mitra, H. A. Wilkinson, A. Elbrecht, J. D. Hermes, J. M. Schaeffer, R. G. Smith and D. E. Moller 1998 Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Molecular Endocrinology* 12:1594-1604.

Zhou, X. and G. K. Hansson 1999 Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scand J Immunol* 50(1):25-30.

Ziegler-Heitbrock, L. 2014 Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol* 289(1-2):135-9.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz 2010 Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16):e74-80.

Zizzo, G. and P. L. Cohen 2013 IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. *J Immunol* 190(10):5237-46.

Zizzo, G., B. A. Hilliard, M. Monestier and P. L. Cohen 2012 Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 189(7):3508-20.

