

Université de Montréal

**Caractérisation des fonctions immunomodulatrices de la**  
***Cardiotrophin-Like Cytokine***

par Sarah Pasquin

Département de pharmacologie et physiologie  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en pharmacologie

Mars, 2019

© Sarah Pasquin, 2019

Université de Montréal  
Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

*Cette thèse intitulée*

**Caractérisation des fonctions immunomodulatrices de la *Cardiotrophin-Like Cytokine***

*Présentée par*

**Sarah Pasquin**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Christian Beauséjour**

Président-Rapporteur

**Jean-François Gauchat**

Directeur de recherche

**Guy Rousseau**

Membre du jury

**Sheela Ramanathan**

Examineur externe

## Résumé

La *Cardiotrophin-Like Cytokine* (CLCF1) est une cytokine de la famille de l'IL-6 connue principalement pour ses fonctions neurotrophiques médiées par l'activation du récepteur au CNTF (CNTFR). Contrairement à son homologue le CNTF, CLCF1 est efficacement sécrété des cellules sous forme de cytokine composite avec le récepteur soluble CRLF1. Des mutations dans les gènes codants pour CLCF1 ou son partenaire de sécrétion le CRLF1 mènent au développement des syndromes CISS et Crisponi, deux syndromes sévères comprenant des phénotypes complexes similaires. L'étude des phénotypes des patients CISS et Crisponi a mené à l'hypothèse de l'existence d'importantes fonctions non redondantes de CLCF1 dans le développement et la régulation du système immunitaire.

Afin de caractériser les activités immunomodulatrices de cette cytokine, nous avons initialement étudié les rôles de CLCF1 dans l'hématopoïèse. Nous avons observé que CLCF1 stimule la prolifération des cellules hématopoïétiques multipotentes et induit l'expansion de celles-ci en absence d'autres facteurs de croissance. *In vivo*, l'administration de la cytokine a fortement accéléré la reconstitution des cellules myéloïdes dans un modèle de transplantation congénique de moelle osseuse. Ces résultats suggèrent des rôles jusqu'alors non identifiés de CLCF1 dans la régulation de la myélopoïèse. Dans une étude subséquente, nous avons évalué la capacité de CLCF1 à moduler l'activation des cellules myéloïdes. Pour ce faire, nous avons étudié l'impact de CLCF1 sur la différenciation et la fonction des macrophages. Au cours de ce projet, nous avons déterminé que CLCF1 1) active les voies de signalisation JAK/STAT dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM), 2) induit l'augmentation de l'expression du récepteur éboueur SR-A1 et 3) favorise la formation des cellules spumeuses proathérogènes. Ensemble, ces résultats indiquent que CLCF1 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique à étudier dans des modèles précliniques d'athérosclérose. Alors que CLCF1 a auparavant été présenté comme un facteur de stimulation des lymphocytes B, les résultats contenus dans les deux premiers articles de cette thèse suggèrent des fonctions biologiques dans la formation et la régulation des cellules myéloïdes.

Parallèlement, nous avons défini de nouvelles interactions biochimiques entre CLCF1 et les lipoprotéines plasmatiques. Nous avons notamment démontré l'existence de complexes entre CLCF1 et l'apolipoprotéine E ainsi qu'avec les lipoprotéines de basse et de très basse densité. De manière intéressante, notre étude indique que les activités biologiques de CLCF1 sont modulées par des lipoprotéines de très basse densité. Ces résultats révèlent une interaction directe entre les lipoprotéines et les cytokines et suggèrent que certaines composantes métaboliques sont en mesure de moduler les fonctions immunes des cytokines.

Les résultats présentés dans cette thèse ont ainsi mené à une meilleure compréhension des propriétés immunomodulatrices de la *Cardiotrophin-Like cytokine* et de son potentiel d'applications thérapeutiques.

**Mots-clés :** *Cardiotrophin-Like Cytokine*, Cytokine, IL-6, Hématopoïèse, Cellule souche hématopoïétique, Myéloïde, Macrophage, Athérosclérose, Apolipoprotéine E, Lipoprotéine plasmatique



## Abstract

Cardiotrophin-Like Cytokine (CLCF1) is a cytokine of the IL-6 family recognized primarily for its neurotrophic functions mediated by CNTF receptor activation (CNTFR). In contrast to its counterpart CNTF, CLCF1 is efficiently secreted as a composite cytokine with the soluble receptor CRLF1. Mutations in the genes encoding for CLCF1 or its secretion partner CRLF1 lead to the development of CISS and Crisponi syndromes, two severe conditions associated with complex overlapping phenotypes. Studying patients' phenotypes led us to hypothesize important, non-redundant CLCF1 functions in the development and regulation of the immune system.

To characterize the immunomodulatory properties of this cytokine, we first studied the roles of CLCF1 in hematopoiesis. We observed that CLCF1 stimulates the proliferation of multipotent hematopoietic cells and induces their expansion in absence of other growth factors. *In vivo*, administration of the cytokine accelerated myeloid cell reconstitution in a model of congenic bone marrow transplantation. These results therefore suggest yet-unidentified roles for CLCF1 in myelopoiesis regulation. In a subsequent study, we assessed the ability of CLCF1 to modulate myeloid cell activation. Assessing the impact of CLCF1 on macrophages functions and differentiation, we determined that CLCF1 1) activates JAK/STAT signaling pathways in bone marrow-derived macrophages (BMDM), 2) induces the upregulation of scavenger receptor SR-A1 expression and 3) promotes the formation of pro-atherogenic foam cells. Altogether, these results indicate that CLCF1 may constitute a novel and attractive therapeutic target to be investigated in preclinical models of atherosclerosis. While CLCF1 has previously been recognized as a B-cell stimulating factor, the results presented in the first two articles of this thesis indicate biological functions for CLCF1 in the formation and regulation of myeloid cells.

In parallel, we defined new biochemical interactions between CLCF1 and plasma lipoproteins. In particular, we have demonstrated the existence of complexes between CLCF1, apolipoprotein E, low- and very low-density lipoproteins. Furthermore, we observed that CLCF1 biological activities are modulated by very low-density lipoproteins. These results

provide evidence of direct interactions between lipoproteins and cytokines and suggest that certain metabolic components modulate the immune functions of type I cytokines.

In conclusion, the results summarized in this thesis have improved our understanding of CLCF1 immunomodulatory properties and of its potential therapeutic applications.

**Keywords:** Cardiotrophin-Like Cytokine, Cytokine, IL-6, Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cell, Myeloid Cells, Macrophage, Atherosclerosis, Apolipoprotein E, Lipoprotein

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
I. Introduction.....	1
1. Les cytokines de la famille de l'IL-6.....	2
1.1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-6.....	2
1.2. Structure des cytokines.....	3
1.3. Structure des récepteurs.....	5
1.3.1. Chaîne alpha.....	6
1.3.2. Gp130.....	7
1.3.3. LIFR $\beta$ .....	8
1.4. Les voies de signalisation des cytokines.....	9
1.4.1. La voie JAK/STAT.....	9
1.4.2. La voie MAPK.....	11
1.4.3. La voie PI3K.....	12
1.5. L'IL-6.....	13
1.6. Le LIF.....	16
1.7. Le CNTF.....	17
1.8. Le CLCF1.....	19
1.8.1. La structure de CLCF1.....	19
1.8.2. Les récepteurs de CLCF1.....	20
1.8.3. Les fonctions biologiques de CLCF1.....	21
1.8.4. Les syndromes CISS et Crisponi.....	26
1.8.5. Les rôles de CLCF1 dans la FSGS.....	28
2. L'Hématopoïèse.....	30
2.1. L'hématopoïèse embryonnaire.....	30

2.2.	L'hématopoïèse adulte .....	31
2.3.	Les cellules souches hématopoïétiques.....	32
2.4.	La myélopoïèse .....	34
2.5.	Les cytokines de la famille de l'IL-6 dans l'hématopoïèse .....	36
2.5.1.	L'IL-6.....	36
2.5.2.	Le LIF .....	37
3.	Les lipoprotéines et les apolipoprotéines.....	38
3.1.	Le métabolisme des lipides et du cholestérol .....	38
3.2.	Les apolipoprotéines .....	40
3.2.1.	Caractéristiques générales des apolipoprotéines.....	40
3.2.2.	Les différentes apolipoprotéines .....	41
3.2.3.	L'apolipoprotéine E .....	42
3.2.3.1.	La structure de l'apoE.....	43
3.2.3.2.	Les fonctions biologiques de l'apoE.....	44
3.2.3.3.	Les isoformes d'apoE .....	45
4.	L'athérosclérose.....	48
4.1.	Le développement de l'athérosclérose.....	48
4.1.1.	Le dysfonctionnement endothélial.....	49
4.1.2.	Les cellules spumeuses et la formation de stries lipidiques.....	50
4.1.3.	Les plaques d'athérome .....	52
4.1.4.	Les plaques d'athérome instables .....	52
4.2.	Les composantes de l'athérosclérose .....	52
4.2.1.	Le métabolisme des lipoprotéines.....	53
4.2.2.	Le système immunitaire.....	55
II.	Hypothèses et objectifs de recherche.....	60
III.	Résultats.....	62
	Article 1. ....	64
	Article 2. ....	92
	Article 3. ....	122
IV.	Discussion et perspectives .....	170
	Les fonctions hématopoïétiques de CLCF1 .....	170

Les effets proathérogènes de CLCF1 .....	178
L'interaction de CLCF1 avec les lipides .....	183
Perspectives de recherches élargies .....	187
Modèles murins pour l'étude de CLCF1 .....	188
Activités biologiques de CLCF1 dans la neuro-inflammation .....	189
Identifications des récepteurs secondaires de CLCF1 .....	189
Fonctions de CLCF1 dans la polarisation des lymphocytes T effectrices .....	192
V. Conclusion .....	194
VI. Bibliographie.....	196
Annexe I.....	I
Annexe II. ....	XV
Annexe III. ....	XLV

## Liste des figures

Figure 1.	Représentation schématique de la structure des cytokines de type 1.....	3
Figure 2.	Représentation schématique des récepteurs humains des cytokines de la famille de l'IL-6 .....	5
Figure 3.	Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT.....	10
Figure 4.	Exemple de la voie de signalisation MAPK induite par la dimérisation des chaînes LIFR $\beta$ et gp130.....	12
Figure 5.	Exemple de la voie de signalisation PI3K induite par la dimérisation des chaînes LIFR $\beta$ et gp130.....	13
Figure 6.	Illustration des différents récepteurs de CLCF1 .....	21
Figure 7.	Illustration des fonctions pléiotropiques de CLCF1 .....	26
Figure 8.	Représentation simplifiée de l'hématopoïèse hiérarchique .....	34
Figure 9.	Exemple de facteurs de transcription et médiateurs solubles impliqués dans la myélopoïèse .....	36
Figure 10.	Composantes des principales lipoprotéines plasmatiques .....	40
Figure 11.	Modélisation de la structure de l'apoE humaine. ....	43
Figure 12.	Représentation schématique des changements conformationnels de la structure d'apoE en présence de lipides.....	44
Figure 13.	Représentation schématique simplifiée des différents stades de progression de l'athérosclérose .....	49

## Liste des abréviations

**A.A.** : acide aminé ; **ABC(A,G)** : *ATP-binding cassette* (A,G); **APC** : cellule présentatrice d'antigène (*Antigen-presenting cell*); **Apo(A,B,C,D,E,H,J,L,M)** : apolipoprotéine ; **ASC** : *apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD* ; **BHE** : Barrière hématoencéphalique ; **BMDM** : Macrophage dérivé de la moelle osseuse (*Bone marrow-derived macrophages*); **BSF3** : *B cell-stimulating factor-3* ; **CBD** : domaine de liaison des cytokines (*cytokine binding domain*); **CD** : groupe de différenciation (*Cluster of differentiation*); **CD 36** : *cluster of differentiation 36*; **C/EBP $\alpha$**  : *CCAAT/enhancer-binding protein- $\alpha$* ; **CETP** : *cholesterol ester transfer protein* ; **CISS**: *cold-induced sweating syndrome*; **CLP**: progéniteur commun des lymphocytes (*Common lymphocytes progenitor*); **CMP**: progéniteur commun des cellules myéloïdes (*Common myeloid progenitor*); **CNTF** : facteur neurotrophique ciliaire (*Ciliary neurotrophic factor*); **CNTFR** : récepteur au CNTF (*CNTF receptor*); **CT-1** : *cardiotrophin-1*; **CLCF1** : *cardiotrophin-like cytokine factor 1* ; **CRLF1** : *cytokine receptor-like factor 1* ; **CSH** : cellules souches hématopoïétiques ; **CVD** : maladie cardiovasculaire (*Cardiovascular diseases*); **DC** : cellule dendritique (*Dendritic cell*) ; **DMPC**: 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; **ERK** : *extracellular signal-regulated kinases*; **FAS** : *fatty acid synthase* ; **FnIII**: fibronectine III ; **FPLC** : chromatographie liquide de protéine rapide (*Fast protein liquid chromatography*); **FSGS** : glomérulosclérose segmentaire focale (*Focal segmental glomerulosclerosis*); **GDP**: guanosine diphosphate; **GTP** : guanosine triphosphate; **GMP**: progéniteur commun des granulocytes (*Common granulocytes progenitor*) ; **gp130**: glycoprotéine 130 ; **Th**: *helper T lymphocyte*; **HDL**: lipoprotéine de haute densité (*High-density lipoprotein*) ; **ICAM** : Molécule d'adhésion intercellulaire (*InterCellular adhesion molecule*) ; **IFN** : interféron ; **IL** : interleukine ; **ILC** : cellule lymphoïde innée (*Innate lymphoid cell*) ; **Ig** : immunoglobuline ; **IgD** : domaine de liaison des immunoglobulines (*Ig-like binding domain*) ; **iPSC** : Cellule souche pluripotente induite (*Induced pluripotent stem cell*) ; **IT-CSH**: CSH intermédiaire (*Intermediate-term hematopoietic stem cell*) ; **JAK** : Janus Kinase; **LCAT** : léthicine-cholestérol acyltransférase; **LC-MS/MS** : chromatographie liquide couple à la spectrométrie de masse en tandem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*) ; **LIF**: facteur inhibiteur de leucémies (*Leukemia inhibitory factor*) ; **LIFR** : récepteur au LIF (*LIF receptor*) ; **LDL**: lipoprotéine de faible densité (*Low-density*

*lipoproteins*); **LDLR** : récepteur des LDL; **LPL** : lipoprotéine lipase; **LPS**: lipopolysaccharide; **LRP** : *LDL receptor-related protein*; **LSK** : cellule Lineage<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>; **LT-CSH** : CSH long-terme (*Long-term hematopoietic stem cell*); **M1** : macrophage pro-inflammatoire ou classique; **M2** : macrophage anti-inflammatoire ou alternatif; **MAPK** : *Mitogen-activated protein kinase*; **M-CSF** : macrophage colony-stimulating factor; **MDP** : progéniteur des monocytes et des cellules dendritiques (*Monocytes/DC progenitors*); **MEP**: progéniteur des érythrocytes et des mégacaryocytes (*Megakaryocytes/Erythrocytes progenitor*); **MHC** : complexe majeur d'histocompatibilité (*Major histocompatibility complex*); **MMP** : metalloprotéinase; **MPO** : myeloperoxydase; **MPP** : progéniteur multipotent; **mTOR**: cible de la rapamycine chez les mammifères (*Mammalian target of rapamycin*); **NLR** : Récepteur de type NOD (*NOD-Like receptor*); **NK** : natural killer; **NP** : neuropoïétine; **NNT-1** : *novel neurotrophin-1*; **NOS** : oxyde nitrique synthase (*Nitric oxide synthase*); **OSM** : oncostatine-M; ac-LDL: LDL acétylé (*Acetylated-LDL*); **oxLDL** : LDL oxydé (*Oxidized LDL*); **PCSK9** : proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9; **PI3K** : phosphoinositide 3-kinase; **PIP**: phosphatidylinositol-phosphate; **PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; **PIP3**: phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; **PPAR $\gamma$** : *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ; **ROS** : espèce réactive d'oxygène (*Reactive oxygen species*); **sCNTFR** : CNTFR soluble; **SHP2** : *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*; **SPR** : résonance de plasmon de surface (*Surface plasmon resonance*); **SOCS** : *suppressors of cytokine signaling*; **SorLA**: *Sortilin-related receptor* ou *Sortilin-related receptor LDLR class A repeats-containing*; **SREBP1**: *sterol regulatory element binding protein-1*; **SR-A1**: récepteur éboueur de type A-1 (*Scavenger receptor A 1*); **STAT** : *signal transducer and activator of transcription*; **ST-CSH** : CSH court-terme (*Short-term hematopoietic stem cell*); **TLR** : *Toll-like receptors*; **TG** : triglycéride; **TGF- $\beta$**  : *transforming growth factor- $\beta$* ; **TNF- $\alpha$**  : *tumor necrosis factor  $\alpha$* ; **VCAM-1** : molécule d'adhésion vasculaire 1 (*Vascular cell adhesion molecule 1*); **VEGF** : *Vascular endothelial growth factor*; **VIH** : virus de l'immunodéficience humaine; **VLDL** : lipoprotéine de très faible densité (*Very low-density lipoprotein*); **WSXWS** : tryptophane-sérine-X-tryptophane-sérine



*À Claire, qui m'a fait découvrir le plaisir d'apprendre*

## Remerciements

J'aimerais d'abord exprimer mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche Dr Jean-François Gauchat. Je le remercie de m'avoir accueillie si chaleureusement dans son laboratoire de recherche. Son support quotidien, sa confiance et son enthousiasme m'ont permis non seulement de mener à bien mes différents projets, mais surtout de pouvoir les réaliser dans un environnement convivial et riche de connaissances. Grâce à son encadrement exceptionnel, sa patience et à tous ces nombreux conseils (souvent maintes fois répétés !) je suis maintenant bien outillée pour la suite de ma carrière scientifique.

Je ne saurais comment le remercier pour toutes les centaines d'heures de discussions, souvent informelles, parfois un peu rocambolesques, mais combien enrichissantes. Ces nombreux échanges m'ont permis de devenir une scientifique plus éclairée avec l'esprit ouvert et l'envie de découvrir. Je lui suis très reconnaissante du partage de ses connaissances, de son écoute active et de ses critiques constructives, qui ont grandement su me faire évoluer.

Je le remercie également pour sa gentillesse ainsi que pour son côté humain et attentionné toujours à l'écoute de ses étudiants. Il a su être d'un grand soutien au laboratoire comme en dehors, autant sur le plan professionnel que personnel. Cher Jean-François, je n'aurais pu espérer meilleur mentor. Merci de m'avoir transmis votre passion de la recherche ! Merci pour tout !

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de laboratoire passés et présents. Un merci particulier à Aurélie Tormo qui m'a prise sous son aile dès mon arrivée et qui a pris le temps de m'enseigner les grandes lignes de la vie de laboratoire. Je la remercie aujourd'hui pour cette belle amitié qui m'est chère. Merci à tous mes stagiaires qui m'ont appris tout autant que ce que j'ai pu leur apprendre. Je remercie Véronique Laplante d'abord pour son dynamisme et aussi pour avoir accepté le défi de reprendre le flambeau de mes projets. Un remerciement sincère à Linda-Anne Beaupré pour tous les petits gestes amicaux qui ont fait de ce département une deuxième famille. Merci à tous les membres du département de pharmacologie et physiologie, leur aide fut précieuse.

Merci à tous mes amis qui transforment mon quotidien en une aventure parsemée de petits et grands bonheurs.

Un merci tout spécial à ma famille qui, malgré l'incompréhension certaine de ce domaine de recherche, a su me soutenir, m'encourager et me motiver tout au long de mon parcours. Merci à Kim pour son magnifique sourire, sa bonne humeur contagieuse et son enthousiasme infatigable envers tous mes projets de vie. Merci à ma chère maman dont l'accompagnement et les encouragements ont été des moteurs essentiels à la réussite de mon parcours scolaire. Par ses accomplissements, elle m'a appris toute la richesse qui se cache derrière le dépassement de soi, je la remercie d'être un si bel exemple à suivre. Je lui suis aussi profondément reconnaissante pour tous les sacrifices qu'elle a faits, sans lesquels les dernières années n'auraient pas été les mêmes. Merci à mon père, dont je suis certaine que cet ouvrage rendrait fier.

Finalement, j'aimerais terminer en remerciant mon conjoint Nicolas. Je le remercie d'avoir partagé tous les hauts et les bas de cette longue épreuve avec moi. Son écoute attentive et ses encouragements ont été d'un grand réconfort. Nicolas, merci d'avoir cru en moi, merci de m'avoir donné la confiance nécessaire pour mener à bien ce projet !

# **I. Introduction**

# 1. Les cytokines de la famille de l'IL-6

## 1.1. Généralités sur les cytokines de la famille de l'IL-6

Le système immunitaire est responsable de protéger l'organisme contre différentes infections, les pathogènes et certains défauts cellulaires. Ce système est constitué de nombreux types de cellules aux fonctions spécifiques et distinctes agissant de concert pour engendrer une réponse immunitaire coordonnée et efficace. Les cytokines sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire (8 à 50 kDa) et de courtes demies-vies assurant une communication intercellulaire efficace entre les cellules impliquées dans la réponse immunitaire (1). Les cytokines opèrent via des modes d'action autocrine, paracrine, juxtacrine, et plus rarement endocrine (1). Les cytokines sont impliquées dans la coordination des réponses immunitaires et l'inflammation, dans l'hématopoïèse, dans la gestation et contribuent également au bon développement des différents systèmes du corps humain. Les cytokines modulent de nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, la survie et l'activation cellulaire. Inversement, certaines cytokines régulatrices ont pour rôles de limiter ou de freiner l'inflammation (1).

Les cytokines sont classées en différentes catégories selon leurs fonctions principales ; les interférons, les chimiokines, les facteurs de croissance, les facteurs de nécrose et les interleukines (IL). Les cytokines peuvent également être sous-classées en fonction de leur structure tridimensionnelle ou de leur affinité pour un récepteur. Par exemple, les cytokines de la famille de l'interleukine-6 (IL-6) regroupent 10 membres dont la caractéristique commune est de posséder au moins une chaîne glycoprotéine 130 (gp130) dans leur récepteur (1).

Les membres de la famille de l'IL-6 sont : l'IL-6, l'IL-11, l'IL-27, l'IL-35, l'oncostatine M (OSM), le facteur inhibiteur de leucémies (LIF), le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), la cardiotrophine-1 (CT-1), la *cardiotrophin-like cytokine* (CLCF1) et la neuropoïétine (NP). Ces cytokines sont notamment impliquées dans l'activation de la réponse immunitaire, la régulation

de l'inflammation et l'embryogenèse. Une activation aberrante de gp130 est associée au développement de nombreuses tumeurs solides et leucémies et plusieurs membres de cette famille ont été identifiés comme ayant des rôles délétères dans les maladies auto-immunes(2).

## 1.2. Structure des cytokines

Les cytokines de la famille de l'IL-6 possèdent toutes une structure tertiaire caractéristique des cytokines hématopoïétiques de classe I à longues chaînes alpha (1, 3). Cette structure comprend 4 hélices alpha antiparallèles connectées deux à deux par des boucles non structurales. Les cytokines de cette famille possèdent des hélices A et D comptant environ 25 a.a. alors que les hélices B et C sont de plus petites tailles avec environ 15 a.a. (1). Les deux premières et les deux dernières hélices sont reliées par de longues boucles de liaison alors que les boucles B et C sont reliées par une boucle plus courte. Contrairement aux cytokines de type 1 à chaînes courtes, les boucles des cytokines à chaînes longues ne contiennent pas de structure  $\beta$  (1). Les cytokines de la famille de l'IL-6 peuvent être sous-divisées en deux groupes selon la forme de la première hélice. En effet, l'IL-6 et l'IL-11 ont des hélices A droite alors que l'hélice A du LIF, de l'OSM et du CNTF est coudée (4, 5). L'hélice A droite permet une affinité pour un récepteur homodimérique gp130/gp130. Le LIF, le CNTF et l'OSM pour leur part signalisent via l'hétérodimérisation des chaînes LIFR $\beta$ /gp130 (1).



Figure 1. Représentation schématique de la structure des cytokines de type 1

D'un point de vue évolutionnaire, les hélices D et les longues boucles de liaison sont les régions les plus conservées des cytokines de type 1 (3). Ceci peut être expliqué par le fait que ces régions contiennent les sites de liaison aux récepteurs. La majorité des cytokines de la famille de l'IL-6 possèdent trois sites de liaison. Les deux premiers sites de liaison (site I et II) ont été identifiés par analogie avec les structures cristallographiques de l'hormone de croissance et de son récepteur (6). Le troisième site de liaison (site III) a pour sa part été identifié à la fin des années 1990 par P. Hienrich (7).

Le premier site de liaison des cytokines de l'IL-6 est localisé à l'extrémité de l'hélice D et dans la boucle AB (8). Ce site de liaison permet aux cytokines d'interagir avec une chaîne alpha, ce site est donc nécessaire pour l'IL-6, l'IL-11, le CNTF et le CLCF1 (7). Ce site de liaison n'est pas retrouvé chez les cytokines dont l'action ne nécessite pas le recrutement d'une chaîne alpha (par exemple le LIF et l'OSM).

Le site II est composé des résidus de l'extrémité N-terminale de l'hélice A et des résidus de la section C-terminale de l'hélice C. Le site II a été identifié comme étant le site responsable de l'interaction avec le domaine de liaison aux cytokines (CBD) de gp130 (7, 8).

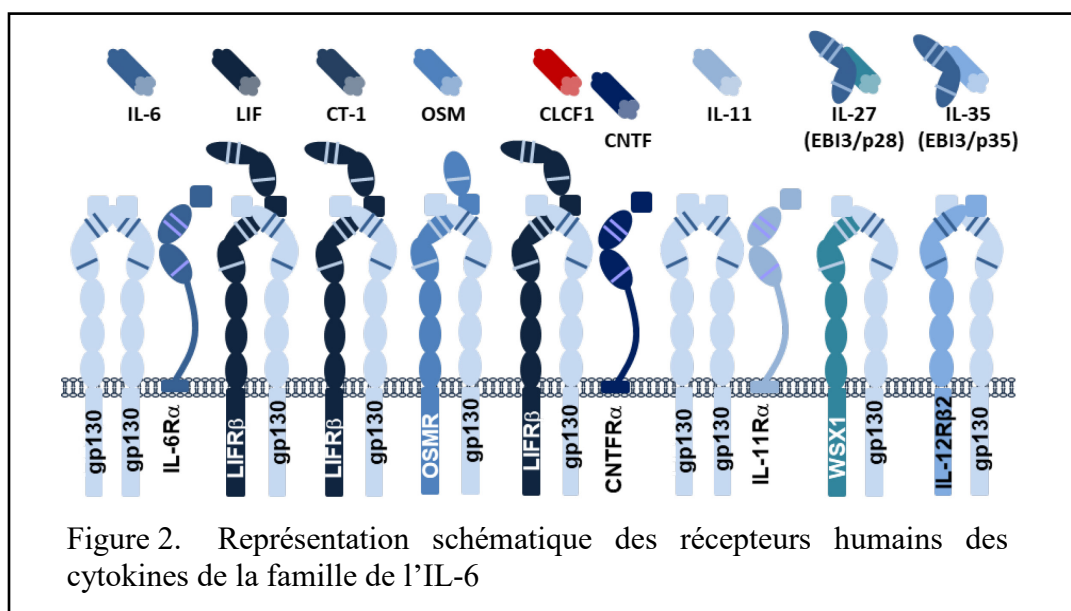
Le site III est localisé à l'extrémité N-terminale de l'hélice D et permet l'interaction de la cytokine avec le domaine de type immunoglobuline (IgD) de la deuxième chaîne transductrice de signal (7, 8).

Ainsi, le site I est impliqué dans le recrutement de la cytokine à la surface des cellules cibles et permet l'adoption d'une structure conformationnelle optimale pour le recrutement subséquent des chaînes impliquées dans la signalisation. Les sites II et III sont quant à eux responsables de la dimérisation des chaînes transductrices de signal et sont par conséquent essentiels à l'activation des voies de signalisation induites par les cytokines de la famille de l'IL-6 (9).

### 1.3. Structure des récepteurs

Les récepteurs des cytokines de la famille de l'IL-6 comprennent un seul segment transmembranaire. Le domaine C-terminal de ces chaînes est intracellulaire alors l'extrémité N-terminale est extracellulaire (3). La longueur de la section intracellulaire varie en fonction de la nature des récepteurs ; cette section s'avère principalement constituée de domaines d'activation des *Janus Kinases* (JAK) et des STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) pour les chaînes signalisatrices et de domaines inactifs très courts pour les chaînes alpha. La fraction extracellulaire des récepteurs aux hématopoïétines est composée d'au moins un domaine de liaison aux cytokines (CBD), peut comprendre un ou des domaines de type immunoglobuline (IgD) et possède dans certains cas des domaines de type fibronectine III (FnIII) additionnels (8, 10).

Les domaines CBD sont des séquences permettant aux récepteurs une spécificité et une haute affinité pour leur cytokine. Les CBD possèdent une organisation structurale conservée : chaque CBD contient deux domaines FnIII dans lesquels certaines cystéines sont fortement conservées afin de favoriser la formation des ponts disulfures (10). Le domaine de l'extrémité carboxy-terminale des CBD est caractérisé par la présence d'une séquence consensus tryptophane-sérine-X-tryptophane-sérine (WSXWS). Le domaine IgD est composé d'un seul domaine de type FnIII partageant une forte homologie avec la région constante des immunoglobulines (1, 3, 8, 10).





### 1.3.1. Chaîne alpha

Parmi les cytokines de cette famille, le LIF, l'OSM, l'IL-27, l'IL-35 et la CT-1 agissent via un récepteur dimérique. Les autres membres de la famille IL-6 nécessitent la présence d'une chaîne alpha pour activer efficacement une réponse cellulaire. Les chaînes alpha ont comme caractéristique commune de ne pas induire de signalisation. La liaison des cytokines à leur chaîne alpha induit la formation d'un complexe de haute affinité pour les chaînes signalisatrices.

Par exemple, l'IL-6R $\alpha$  est constituée d'un IgD, d'un CBD et d'un court segment transmembranaire. L'IL-6 se lie au segment CBD de l'IL-6R $\alpha$  (8). L'expression de l'IL-6R $\alpha$  est relativement restreinte, cette chaîne est notamment exprimée par les hépatocytes, les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes T (11). Par un clivage protéolytique, l'IL-6R $\alpha$  peut être clivée de la membrane cellulaire et se retrouver sous forme soluble (12). L'IL-6R $\alpha$  soluble garde la capacité de lier l'IL-6. Le complexe IL-6/IL-6R $\alpha$  soluble est biologiquement actif et est en mesure d'induire l'homodimérisation de gp130 (11). La signalisation induite par le complexe membranaire IL-6/IL-6R $\alpha$  est appelée signalisation en cis alors que la signalisation découlant du complexe soluble IL-6/IL-6R $\alpha$  est nommée signalisation en trans.

Comme l'IL-6R $\alpha$ , l'IL-11R $\alpha$  comprend également un domaine CBD, un domaine de type IgD ainsi qu'une section transmembranaire. L'IL-11 se lie à l'IL-11R $\alpha$  par le segment CBD (10). Des études sur le profil d'expression de l'ARNm de l'IL-11R $\alpha$  montrent la présence de ce récepteur dans les glandes mammaires et dans plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein (13). L'IL-11R $\alpha$  est aussi présente à la surface des cellules épithéliales et des mégacaryocytes. Plus récemment, une signalisation en trans de l'IL-11 a été documentée, il a été suggéré que la métalloprotéase ADAM10 serait responsable du clivage protéolytique de ce récepteur (14). Le complexe soluble IL-11/IL-11R $\alpha$  est biologiquement actif (14).

Le CLCF1, et le CNTF partagent la même chaîne alpha appelée CNTFR $\alpha$ . Le CNTFR $\alpha$  contient un CBD et un IgD (10, 15). Contrairement aux autres chaînes réceptrices de la même famille, la chaîne alpha du CNTFR n'est pas transmembranaire, mais ancrée dans la membrane par l'entremise d'un glycosyl-phosphatidyl-inositol (ancrage GPI) (15). Comme l'IL-6R $\alpha$  et l'IL-

11R $\alpha$ , le CNTFR $\alpha$  est sensible au clivage enzymatique et peut donc se retrouver sous forme soluble (16). La chaîne alpha du récepteur au CNTF est exprimée dans les muscles squelettiques, les neurones, la rétine, les adipocytes, le rein et les intestins (17).

L'hypothèse de l'existence d'une chaîne alpha nécessaire à la signalisation de la CT-1 a été proposée en 1997 par le laboratoire de H. Gascan (18). Cette chaîne alpha n'a toutefois pas encore été identifiée.

### **1.3.2. Gp130**

GP130 est une chaîne signalisatrice commune à toutes les cytokines de la famille de l'IL-6. Il s'agit d'un récepteur ubiquitaire de 130 kDa. La partie extracellulaire de gp130 contient trois domaines FnIII, un domaine CBD et un domaine IgD (3). Le site II, similaire pour la majorité des cytokines de la famille, se lie au CBD de gp130 alors que le site III de l'IL-6 et de l'IL-11 se lie au domaine IgD du même récepteur (3). Dans le cas de l'IL-6 et de l'IL-11, des études de cristallographie ont montré que ces cytokines ont la capacité de former des complexes hexamériques comprenant un ratio 2:2:2, c'est-à-dire 2 ligands, 2 chaînes alpha et 2 gp130 (9). L'activation de tels complexes induirait une signalisation plus efficace.

La section intracellulaire de gp130 contient différents résidus responsables de la cascade de signalisation induite par la liaison ligand/récepteur. À proximité de la membrane, gp130 contient une région riche en prolines (PXXXP) impliquée dans la liaison avec les JAK appelée boîte 1 et une région riche en acide aminé hydrophobe importante pour l'activation de JAK2 appelée boîte 2 (19). À l'extrémité distale à la membrane, la séquence gp130 contient 4 tyrosines aux positions 767, 814, 905 et 915 essentielles à la phosphorylation de STAT1 et STAT3 (20-22). Une tyrosine à la position 759 chez l'humain permet le recrutement SHP2 assurant une régulation négative de gp130 (22).

La signalisation induite par l'activation de gp130 est essentielle au développement. Les souris déficientes en gp130 ne sont pas viables, les embryons décèdent entre jour E12 et E16 en raison de défauts développementaux dans l'épiblaste (23). Chez l'humain une mutation faux sens (N404Y) dans le gène codant pour gp130 a récemment été identifiée chez une patiente (24).

Cette mutation a pour effet d'inhiber les activités biologiques découlant de l'IL-6, de l'IL-11 et de l'OSM, mais n'a pas affecté la signalisation dépendante du LIF. Non létale, cette mutation a mené au développement d'un syndrome d'immunodéficience sévère semblable à celle observée lors de la déficience de STAT3 et des anomalies squelettiques importantes (24). Ces observations sont représentatives de l'importance de la signalisation induite par gp130.

### 1.3.3. LIFR $\beta$

La chaîne LIFR $\beta$  est commune à six cytokines de la famille de l'IL-6 chez l'humain : le LIF, le CNTF, le CLCF1, la CT-1 et l'OSM (10). LIFR $\beta$  est exprimée par une très grande variété de cellules du corps. Son expression est détectable dans le foie, les os, le système nerveux central, les cellules immunes, l'utérus et les reins (25). LIFR $\beta$  est le plus grand récepteur de cette famille avec 6 domaines extracellulaires distincts. La section N-terminale contient deux domaines CBD séparés par un domaine IgD, qui sont espacés de la surface membranaire par trois domaines FnIII additionnels. LIFR $\beta$  est très similaire à gp130, mais possède un domaine CBD supplémentaire. Le site III des cytokines CNTF, CLCF1, CT-1 et OSM se lie à l'IgD de LIFR $\beta$  (10, 25).

La partie intracellulaire de LIFR $\beta$  est fortement apparentée à celle de gp130. La région proximale à la membrane contient un domaine PXXXP de recrutement des JAK alors que la section la distale possède 3 motifs tyrosines YXXQ responsables de l'activation des STAT (21).

Chez l'humain, des mutations dans le gène codant pour LIFR $\beta$ , abolissant la signalisation de tous les ligands de LIFR $\beta$ , mènent au syndrome de Stüve-Wiedemann (26). Il s'agit d'un syndrome sévère, généralement létal affectant plusieurs systèmes du corps humain. Les patients ont des phénotypes marqués au niveau des os (ostéopénie, scoliose) et des neurones du système nerveux autologue (contrôle déficient de la faim, de la température corporelle, de la respiration) (26). Chez la souris, la déficience de LIFR $\beta$  n'est pas viable ; les rongeurs décèdent en phase périnatale et démontrent des déficits marqués dans le nombre de neurones moteurs suggérant un rôle important pour LIFR $\beta$  dans le développement (27).

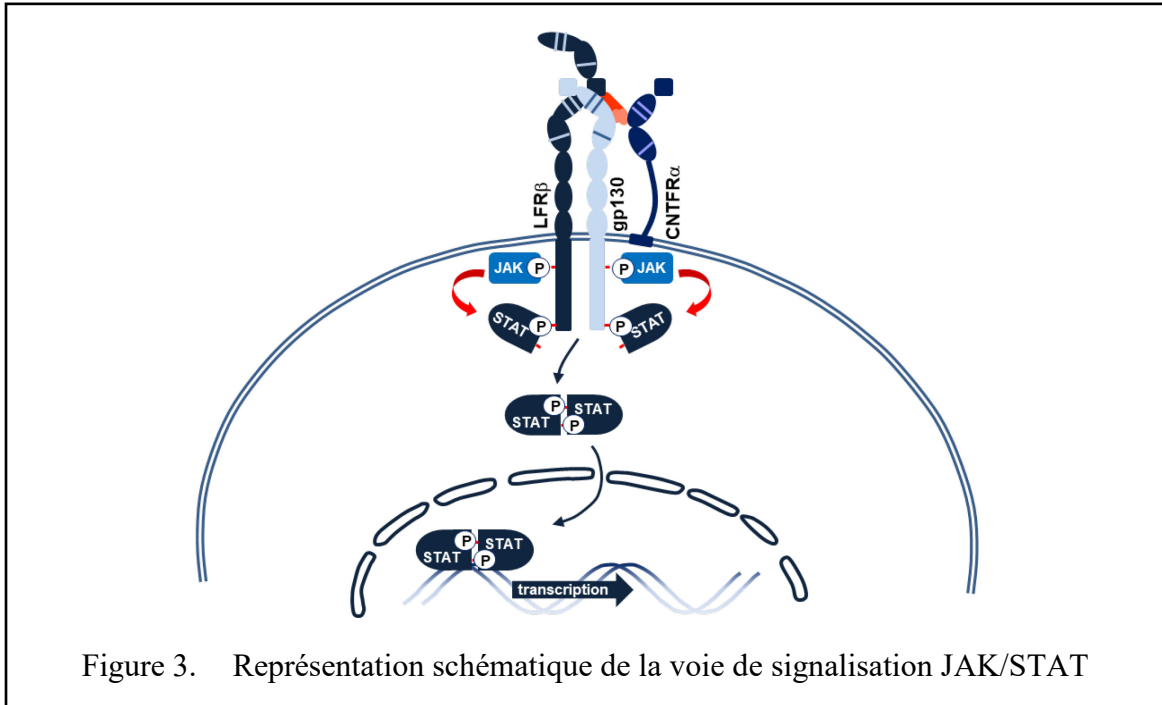
## 1.4. Les voies de signalisation des cytokines

### 1.4.1. La voie JAK/STAT

La voie des Janus Kinases et des *Signal Transducer and Activator of Transcription*, communément appelés JAK/STAT, est une voie de signalisation importante dans les fonctions des cytokines de type IL-6. Cette voie de signalisation est impliquée surtout dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (7).

La cascade de signalisation JAK/STAT débute d'abord par la phosphorylation des tyrosines kinases de la famille des JAK. Les JAK sont constitutivement liées aux régions riches en proline des chaînes signalisatrices des récepteurs. La liaison des sites II et III des cytokines aux CBD et IgD des chaînes transductrices du signal des récepteurs engendre la dimérisation de ces chaînes. La dimérisation facilite alors la phosphorylation croisée des JAK menant à leur activation. La famille des JAK est composée de JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent JAK1, JAK2 et TYK2, mais ne semblent pas réguler JAK3 (28).

Une fois activées, les JAK ont pour fonction de phosphoryler les tyrosines cytoplasmiques des récepteurs (28). Les phosphotyrosines sont essentielles au recrutement des STAT. Le domaine SH2 favorise l'ancrage des STAT aux phosphotyrosines des chaînes réceptrices. Ce recrutement permet la phosphorylation des résidus tyrosines de la région C-terminale des STAT par les JAK (19, 28). Les JAK peuvent également phosphoryler les résidus sérine des STAT avec une cinétique plus lente. La phosphorylation des tyrosines et/ou des sérines induit un changement de la conformation des STAT qui induit le relargage de ceux-ci (28). Une fois activées, les STAT peuvent dimériser et transloquer au noyau. Les homodimères ou les hétérodimères de STAT au noyau vont s'associer à différents promoteurs d'ADN afin de favoriser ou inhiber la transcription des gènes d'intérêts (29).



À ce jour, sept STAT ont été identifiés dans la littérature : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6 (29). À l'exception de STAT4, tous les autres STAT sont exprimés de manière ubiquitaire. Les cytokines de la famille de l'IL-6 activent les STAT1, 3 et 5, alors que STAT 2, STAT4 et STAT6 sont activées majoritairement en réponse aux cytokines de la famille de l'IL-4 et l'IL-12 (29).

STAT3 est le facteur de transcription le plus activé en réponse aux cytokines de type I. Ce STAT, identifié dans le milieu des années 1990, possède des rôles prépondérants dans le déclenchement de la réponse immune, dans la différenciation des cellules CD4 en cellules Th17, dans le maintien de la pluripotence ainsi que dans la survie et la régulation du cycle cellulaire (transition des phases G1 à S) (30). Parmi les cibles de STAT3, on retrouve entre autres c-myc, PIM-1, ROR $\gamma$ t, HIF-1 $\alpha$ , HSP90, p53, IL-6 et VEGF (29). L'activation constitutive de STAT3 est associée à la croissance et la survie de plusieurs cellules cancéreuses (31, 32). À l'inverse, une mutation causant un défaut d'activation de STAT3 est la cause d'un grave syndrome d'immunodéficience de type hyper-IgE (33).

STAT1 est également activé en réponse aux cytokines de type IL-6. Ce STAT possède plusieurs rôles redondants avec les autres STAT, toutefois l'étude des souris KO pour STAT1 a rendu possible l'identification des fonctions non redondantes de ce facteur de transcription. Les souris déficientes en STAT1 ont d'importants défauts dans la réponse aux IFNs et s'avèrent ainsi plus sensibles aux infections microbiennes et virales (34). Ces souris ont également permis d'identifier STAT1 comme un facteur proapoptotique impliqué dans la protection contre les tumeurs. Il s'agit aussi d'une composante importante de la régulation des facteurs de croissance tels que FGF (35). Dans l'ensemble, STAT1 semble être un régulateur négatif de la croissance cellulaire contrairement à STAT3 qui favorise la croissance et la survie cellulaire (36).

Il existe deux variants de STAT5, STAT5a et STAT5b transcrits par 2 gènes différents qui partagent 96% d'homologie. La différence entre ces deux STAT se trouve dans la région C-terminale (37, 38). Les STAT5 sont activés en réponse à l'IL-3, à l'IL-2, à la prolactine, à l'hormone de croissance, à l'OSM et à l'IL-6 (35). STAT5 régule notamment la réponse des lymphocytes T, elle est essentielle à la croissance des cellules T en réponse à l'IL-2 et favorise la formation des lymphocytes T régulateurs (37).

### **1.4.2. La voie MAPK**

Outre la voie JAK/STAT, la liaison d'un ligand à gp130 peut engendrer l'activation de la voie de signalisation des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Cette cascade de signalisation est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, la migration cellulaire, la survie, la différenciation et la prolifération des cellules (39). Cette voie est fortement associée au développement de cancers et de métastases (39). Les phosphotyrosines des chaînes gp130 et LIFR $\beta$  activées par les JAK sont des sites d'amarrages pour la tyrosine phosphatase SHP2 (7). Comme dans le cas des STAT, les résidus tyrosines de SHP2 sont phosphorylés par les JAK rendant la protéine active. Une fois activée, SHP2 est en mesure de recruter un complexe dimérique formé de la petite protéine adaptatrice Grb2 et un facteur d'échange de guanylnucléotide appelé SOS (Grb2/SOS) (40). La formation du complexe trimérique SHP2/Grb2/SOS permet de localiser SOS à la membrane plasmique où se trouve la petite

GTPase Ras (40). À la membrane, SOS engendre l'activation de Ras en effectuant la substitution d'une GDP par une GTP. L'activation de Ras induit ensuite l'activation du second messenger Raf. Cette activation est suivie de la phosphorylation de MEK puis de ERK1/2. Une fois actif, ERK1/2 peut transloquer au noyau et s'associer aux promoteurs de c-FOS, c-Jun et c-Myc pour induire différentes réponses cellulaires (40, 41).

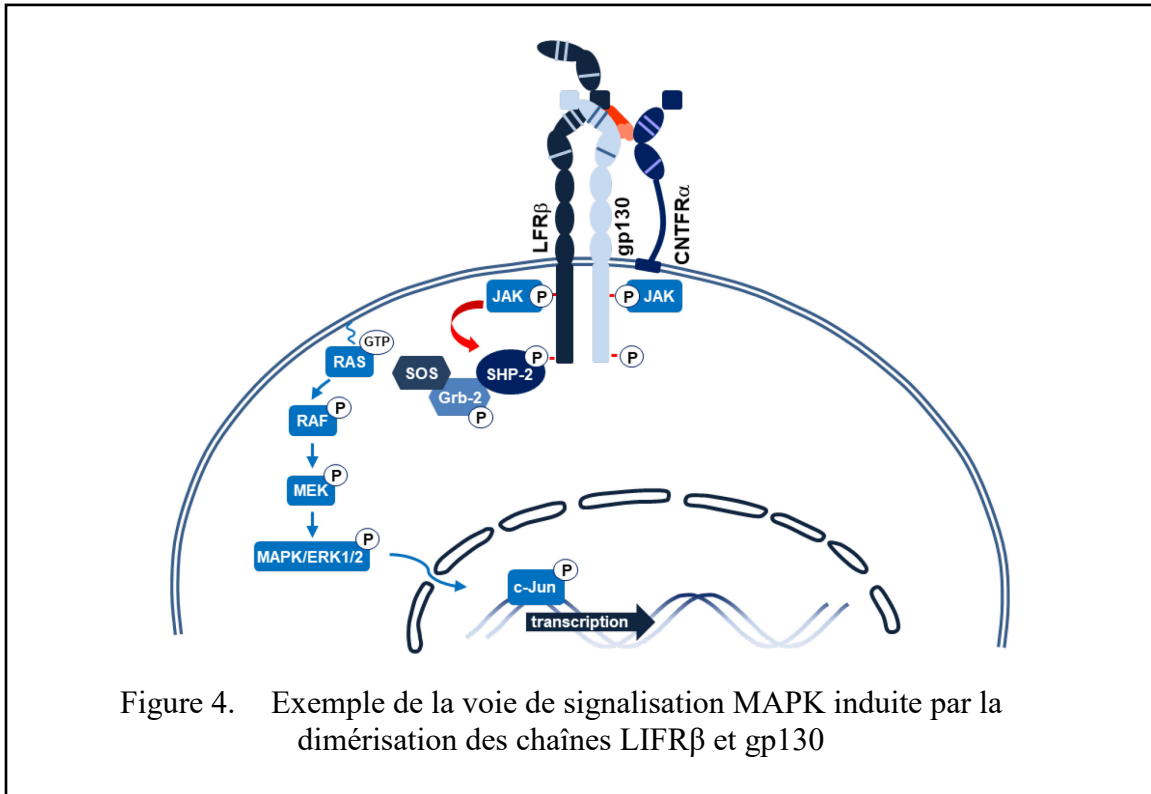


Figure 4. Exemple de la voie de signalisation MAPK induite par la dimérisation des chaînes LIFRβ et gp130

### 1.4.3. La voie PI3K

Une troisième voie de signalisation pouvant être activée par les cytokines de la famille de l'IL-6 est la voie des *phosphatidyl inositol 3 kinase* (PI3K) (42). La tyrosine phosphatase SHP2, impliquée dans la voie MAPK détaillée précédemment, possède la capacité de recruter la sous-unité p85 de PI3K. PI3K est composé de deux sous-unités, une sous-unité régulatrice dite p85 ainsi qu'une sous-unité catalytique appelée p110 (43). La sous-unité p85 peut être recrutée par SHP2 alors que la sous-unité p110 peut être directement activée par Ras. L'une ou l'autre de ces associations induit l'activation de PI3K, dont la fonction principale est de phosphoryler les

phospho-inositols membranaires tels que PI3P, PIP2 et PIP3(43). La phosphorylation de PIP3 permet alors le recrutement d'AKT à la membrane. La localisation d'AKT à la membrane permet son activation via la phosphorylation de ses sérines et thréonines par la *phosphatidylinositol-3-dependent kinase 1* (PDK1). Une fois activée, AKT régule de nombreuses fonctions biologiques; par exemple l'activation de mTORC1 favorise la prolifération, la régulation de Bcl-2 influence la survie cellulaire alors que l'activation de Rac-1 promeut la migration (44).

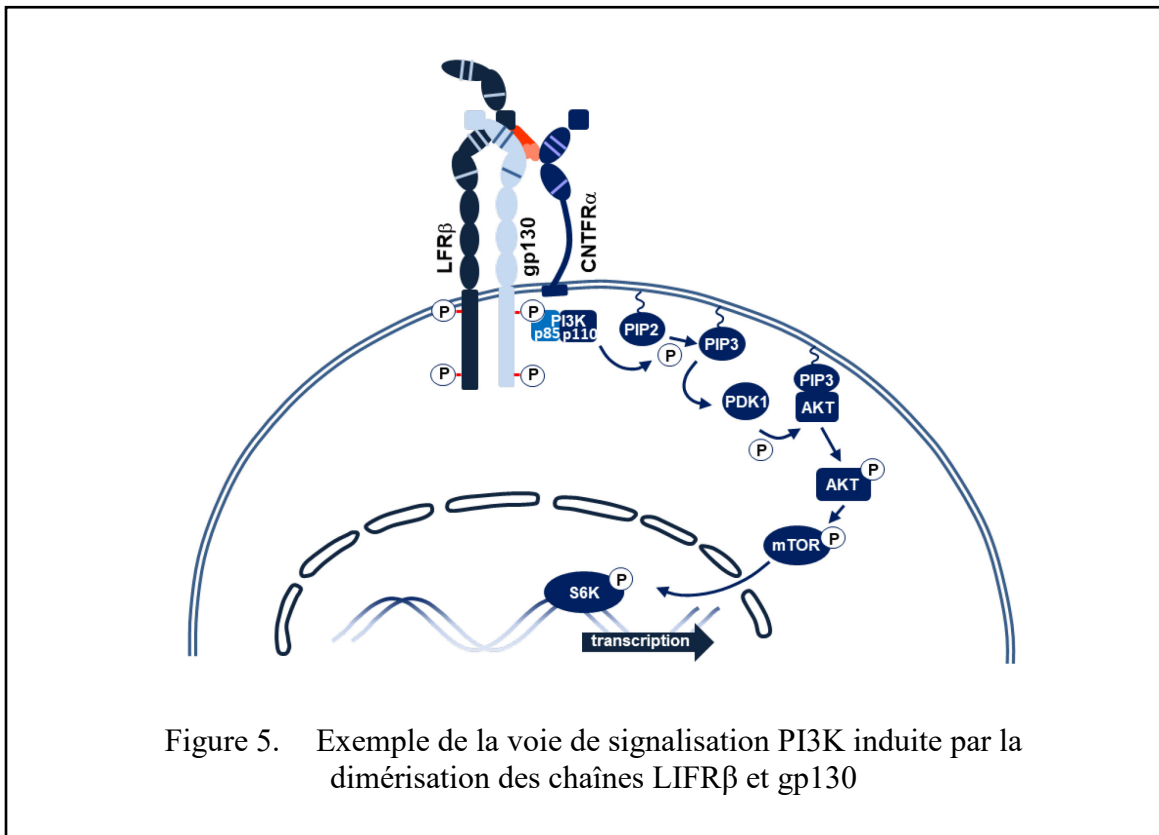


Figure 5. Exemple de la voie de signalisation PI3K induite par la dimérisation des chaînes LIFRβ et gp130

## 1.5. L'IL-6

L'IL-6 est une des cytokines inflammatoires les plus importantes chez l'humain (11). L'ADNc de l'IL-6 a été cloné pour la 1<sup>re</sup> fois en 1986 à partir d'ARNm de cellules T par le groupe du Dr Kishimoto (45). Originellement nommée *B cell stimulatory factor 2* (BSF2) en raison de sa capacité à induire la production d'immunoglobulines, l'IL-6 possède de nombreuses fonctions



biologiques anti et pro-inflammatoires sur divers types de cellules (45). Cette cytokine influence notamment la prolifération des lymphocytes en favorisant la sécrétion d'IL-2, elle promeut la formation d'ostéoclastes, la différenciation des T CD4 en Th17 et est impliquée dans la réponse inflammatoire aiguë (46). L'IL-6 consiste en une séquence de 184 a.a. produisant une protéine glycosylée de 26 kDa (11). Cette protéine est synthétisée par les cellules endothéliales, les fibroblastes, les monocytes, les lymphocytes T et B ainsi que les cellules souches mésenchymateuses (47). Tel que mentionné à la section 1.3.1, l'IL-6 induit ses fonctions biologiques par l'entremise d'un récepteur trimérique composé d'une chaîne IL-6R $\alpha$  et de deux chaînes gp130 (9). Par l'activation des métalloprotéinases de la matrice ou encore par épissage alternatif, l'IL-6R $\alpha$  peut se trouver sous forme soluble et former un complexe soluble IL-6/IL-6R $\alpha$  biologiquement actif (12, 48). L'IL-6 possède donc la capacité d'induire deux types de signalisation dites cis et trans. La signalisation cis (ou classique), résultant d'une interaction de la cytokine avec une chaîne alpha ancrée à la membrane, est connue pour induire des effets anti-inflammatoires favorisant la réparation et la régénération tissulaire (11, 49). À l'inverse, la signalisation trans semble favoriser principalement des effets pro-inflammatoires (11, 49).

L'étude des souris déficientes pour l'IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) a permis l'identification de plusieurs rôles non redondants de cette cytokine. Par exemple, les souris IL-6<sup>-/-</sup> présentent des défauts dans la régénération des cellules hépatiques et pancréatiques, elles ont aussi une réponse immunitaire humorale défectueuse, ainsi qu'une réponse antivirale fortement diminuée (46). Les souris déficientes en IL-6 arborent aussi un défaut au niveau du recrutement des lymphocytes aux sites d'infections, suggérant un rôle chémoattractant important pour la cytokine (50). Les souris IL-6<sup>-/-</sup> démontrent également des anomalies dans le processus de guérison des plaies de la peau en raison d'un manque d'angiogenèse, de dépôt de collagène et d'un manque de recrutement leucocytaire (51). L'IL-6 est aussi connu pour favoriser la différenciation des cellules Th17 et diminuer la production de Treg (52). L'IL-6 est également une cytokine impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation ainsi que dans l'induction de la fièvre (53). En effet, l'administration d'IL-6 recombinant chez le lapin a mené à une rapide fièvre monophasique, indiquant que cette cytokine est un pyrogène endogène (53, 54). Des études subséquentes effectuées chez les rats ont confirmé que les taux d'IL-6 sont fortement augmentés dans le sérum et le liquide cérébrospinal dans un modèle de fièvre induite par LPS (55).

Les fonctions spécifiques à la signalisation en trans de l'IL-6 ont entre autres été étudiées grâce une protéine de fusion composée de l'IL-6 et de l'IL-6R $\alpha$  reliées entre elles par un lien polypeptidique flexible. Cette protéine de fusion générée par le laboratoire du Dr Rose-John est appelée hyper-IL-6 (56). L'injection d'hyper-IL-6 chez la souris a permis d'identifier les fonctions biologiques découlant uniquement de la signalisation en trans de l'IL-6. Parmi ces fonctions, on retrouve entre autres la réparation tissulaire hépatique, la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, la différenciation des neuroblastomes, le recrutement des cellules immunes mononucléées, l'activation des cellules musculaires lisses et la stimulation cellules endothéliales (11).

En raison de ces nombreuses fonctions immunomodulatrices, la surproduction d'IL-6 est considérée comme délétère dans plusieurs maladies immunitaires. L'IL-6 a d'ailleurs été étudiée pour ses rôles dans l'arthrite rhumatoïde, l'arthrite juvénile idiopathique, la sclérose en plaques, l'athérosclérose, les leucémies, le diabète, etc. (46). Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été élaborées pour cibler l'IL-6. La plus connue est celle basée sur le tocilizumab, approuvé en clinique dans plus d'une centaine de pays pour le traitement l'arthrite rhumatoïde et l'arthrite juvénile idiopathique, la maladie de Crohn et la maladie auto-immune de Castelman (57). Le tocilizumab est un anticorps monoclonal murin humanisé dirigé contre l'IL-6R $\alpha$  qui a pour effet de bloquer toutes les formes de signalisations induites par l'IL-6 (58).

Puisque la signalisation en trans s'avère responsable de la majorité des activités pro-inflammatoires de l'IL-6, des stratégies thérapeutiques ont été développées pour inhiber spécifiquement la signalisation en trans. Ces stratégies plus ciblées ont été mises de l'avant afin de diminuer les rôles délétères de la cytokine tout en maintenant les effets réparateur et protecteur de l'IL-6 médiés par l'entremise de la signalisation en cis. Parmi ces stratégies, on retrouve le développement d'une protéine de fusion sg130Fc. Le sg130Fc développé par le Dr S. Rose-John et son équipe est une protéine recombinante formée de deux segments extracellulaires de gp130 reliés par un groupement Fc (fraction constante de l'IgG1 humain) (59). Cette protéine dimérique agit comme une trappe pour le complexe soluble IL-6/IL-6R $\alpha$ . Puisque l'IL-6 seule ne possède pas d'affinité pour gp130, la protéine sg130Fc inhibe

spécifiquement le complexe soluble IL-6/IL-6R $\alpha$  sans affecter la signalisation classique (cis) (11, 59). L'efficacité thérapeutique de cette protéine de fusion a été démontrée dans plusieurs modèles animaux représentatifs de maladies humaines telles que l'asthme, l'arthrite, le lupus, l'inflammation intestinale, de nombreux modèles de cancer et dans l'athérosclérose (11).

## 1.6. Le LIF

Le LIF est une cytokine de 20 kDa dont la structure a été identifiée par cristallographie en 1994 (60, 61). Sa structure est similaire à celle des cytokines de la même famille avec 4 hélices alpha antiparallèles. Des analyses supplémentaires de résonance magnétique ont pour leur part démontré que le LIF arborait une structure moléculaire très stable (25). Contrairement aux autres cytokines de type IL-6, le LIF possède une grande affinité à la fois pour la chaîne gp130 et pour la chaîne LIFR $\beta$ . Le LIF diffère donc de L'IL-6 qui, tout comme l'IL-11, le CNTF et le CLCF1, se lie à son récepteur de façon séquentielle puisqu'en absence de chaîne alpha, la majorité des cytokines ne possèdent pas d'affinité pour gp130 (9, 62). L'hétérodimérisation de LIFR $\beta$  et gp130 induite par la liaison du LIF active les voies de signalisation JAK/STAT, MAPK et PI3K (25).

Le LIF est un élément important du développement puisqu'il maintient la pluripotence des cellules souches et régule leur autorenouvellement. Le LIF est également nécessaire pour la formation et le maintien des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) en activant des facteurs de transcriptions clés tel que Oct3/4, SOX2, et klf4 (63). Le LIF est un facteur important dans la reproduction. Par exemple il s'agit d'une cytokine essentielle pour l'implantation des blastocystes. En effet, la production du LIF par les glandes endométriales prépare l'épithélium pour le rendre réceptif à l'implantation du blastocyste. Un des défauts majeurs des souris déficientes en LIF est d'ailleurs leur infertilité (64).

Outre la reproduction, le LIF régule le développement et le remodelage osseux. Les ostéoblastes sont des cellules du système immunitaire promouvant la formation osseuse. Le LIF favorise la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et inhibe leur

différentiation en adipocyte (65). De plus, le LIF inhibe la synthèse de la sclérostine, un puissant inhibiteur de la formation osseuse (25).

La régulation du métabolisme par le LIF ainsi que son implication dans les syndromes métaboliques associés à l'obésité ont fait l'objet d'une courte revue de la littérature intitulée « *Cytokines of the LIF/CNTF Family and Metabolism* » publiée dans le journal *Cytokines* (Annexe I) (66).

Le LIF possède des rôles immunomodulateurs importants. Les cellules T régulatrices par exemple produisent des quantités considérables de LIF et le LIF a été démontré chez la souris pour induire l'activation du facteur de transcription Foxp3 (67). LIF exerce aussi des effets anti-inflammatoires en réprimant l'activation de ROR $\gamma$ t et donc la différenciation des cellules Th17 (67). Lors d'une réaction inflammatoire aiguë, le LIF contrôle l'inflammation en diminuant la production d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  et en favorisant la synthèse d'IL-10 (68). L'injection de LIF recombinant chez la souris a mené à l'augmentation du nombre de mégacaryocytes et de plaquettes suggérant des rôles pour cette cytokine dans la thrombopoïèse (25). Récemment il a été montré que les ILC (*Innate Lymphoid Cells*), particulièrement les ILC de type 3, produisent du LIF (69).

De manière intéressante, les différentes fonctions biologiques du LIF ont mené à l'élaboration d'essais cliniques pour le traitement de l'infertilité, de la thrombopénie induite par la chimiothérapie et pour le traitement de différentes neuropathies (70-72).

## **1.7. Le CNTF**

Dans le cadre de mes études doctorales, j'ai eu l'opportunité de faire une recherche bibliographique exhaustive sur les fonctions biologiques du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) qui ont été résumées dans une revue de la littérature publiée dans le journal *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Annexe 2) (17). Cette section est donc un bref résumé des informations tirées de cette revue sur les caractéristiques et les fonctions du CNTF.

Le CNTF est un facteur neurotrophique pluripotent de 22,7 kDa identifié à la fin des années 1980 dans les neurones ganglionnaires ciliaires d'embryon de poulet (73). Le CNTF est exprimé par les cellules gliales de la moelle épinière, les astrocytes, les cellules de Schwann et les muscles squelettiques. Le CNTF ne possède pas de peptide signal et n'est donc pas efficacement sécrété. Il s'agit donc un facteur relâché en réponse à une blessure ou un traumatisme lors de la rupture des cellules (17, 74).

Le CNTF signale à travers un récepteur hétérotrimérique composé des chaînes CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  et gp130 (15). De par son récepteur, ce facteur neurotrophique possède des activités biologiques redondantes avec les cytokines LIF, CLCF1, CT-1 et OSM. Récemment, le laboratoire du Dr Petersen a démontré qu'*in vitro* en absence de CNTFR $\alpha$ , la Sortiline pouvait se substituer à la chaîne alpha pour permettre au CNTF d'induire la dimérisation de LIFR $\beta$  et gp130 (75). La liaison de CNTF à son récepteur induit l'activation des voies de signalisation JAK/STAT(1,3,5a), MAPK-ERK1/2 et PI3K/AKT (17).

Le CNTF exhibe des propriétés neuroprotectrices, favorise la neurogenèse, possède des fonctions immunomodulatrices, régule le métabolisme de même que la formation osseuse (17). Le CNTF a été largement étudié pour ses capacités à induire la différenciation des neurones, la croissance des neurites et pour ses rôles dans la survie des neurones moteurs de la moelle épinière (17). Pour ses capacités neuroprotectrices, le CNTF a été testé dans des études cliniques chez des patients atteints de la maladie d'Huntington de stade I et II (76-78). Les résultats ont démontré une efficacité limitée, mais suggèrent tout de même un potentiel thérapeutique pour la cytokine.

Le CNTF régule également la neuroinflammation en favorisant entre autres la survie et la maturation des oligodendrocytes (79). Dans un modèle murin de sclérose en plaques, l'administration chronique de CNTF recombinant a mené à une diminution significative des symptômes de cette maladie suggérant un potentiel thérapeutique du CNTF dans la sclérose en plaques (80). Le CNTF possède également des rôles neuroprotecteurs dans la rétine; ses rôles bénéfiques dans la dégénérescence maculaire ont été largement étudiés dans les dernières années (17, 81). Notamment, des capsules contenant de cellules épithéliales de la rétine surexprimant

le CNTF ont été désignées comme drogue orpheline par la FDA pour le traitement de la rétinite pigmentaire et la télangiectasie maculaire (NT-501, Neurotech) (82). En juin 2017, des études cliniques de phase II ont montré des résultats bénéfiques très prometteurs de l'utilisation de NT-501 pour le traitement de la télangiectasie maculaire ([www.neurotechusa.com](http://www.neurotechusa.com)). En conclusion, le CNTF possède des effets pléiotropiques importants et un potentiel thérapeutique prometteur dans diverses maladies métaboliques et neurodégénératives.

## **1.8. Le CLCF1**

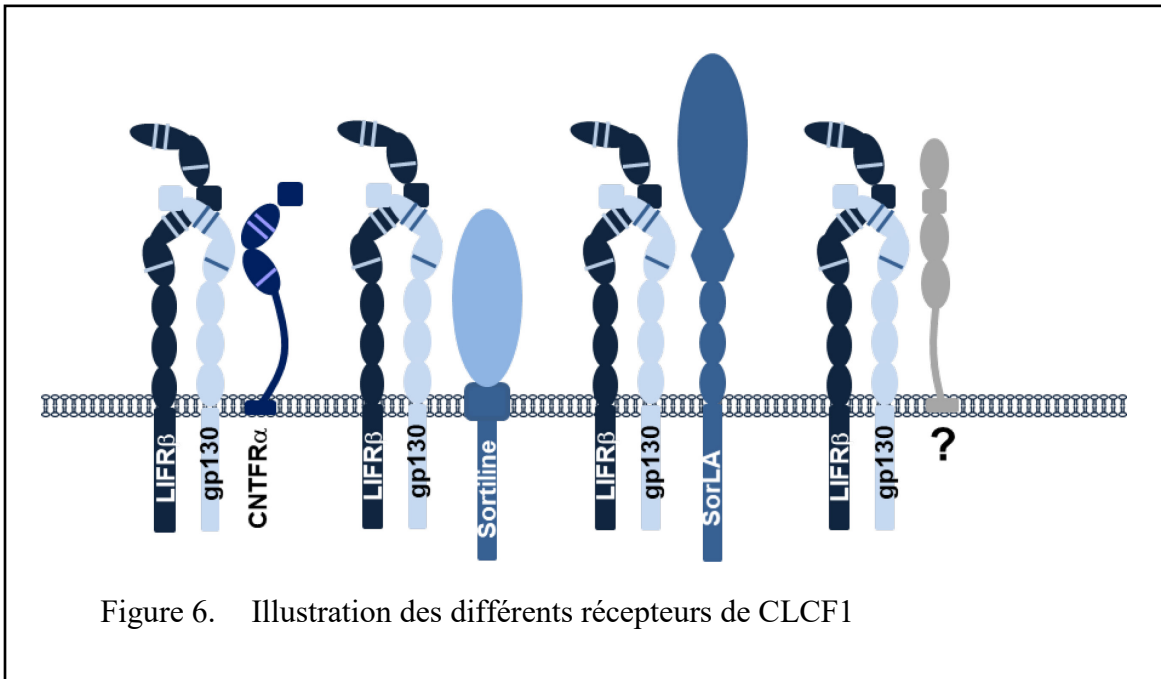
### **1.8.1. La structure de CLCF1**

La Cardiotrophin-Like Cytokine (CLCF1), initialement nommée Novel B cells stimulatory factor 3 (BSF3) et Novel Neurotensin-1 (NNT-1), est une cytokine de la famille de l'IL-6 ayant été identifiée à la fin des années 1990 par l'entremise du clonage de son l'ADNc de CLCF1 dans l'ARNm de la lignée de cellules T humaines Jurkats (83, 84). Le gène du CLCF1 situé chez l'humain sur le chromosome 11 code pour une protéine de 225 acides aminés. La cytokine de 22 kDa est composée de 4 chaînes alpha antiparallèles partageant une homologie de séquence et de structure avec les cytokines CNTF et CT-1 (83, 84). CLCF1 possède un peptide signal de 27 a.a., toutefois cette cytokine nécessite de former un complexe avec le récepteur soluble aux cytokines *Cytokine Receptor Like Factor 1* (CRLF1) pour être efficacement sécrété (85). CLCF1 peut également être partiellement sécrété des cellules par association avec le CNTFR $\alpha$  soluble (86). Ainsi, physiologiquement, CLCF1 est sécrété sous forme de cytokine composite CRLF1/CLCF1 ou CLCF1/sCNTFR $\alpha$ . CLCF1 est principalement exprimé par les cellules immunes des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes circulants et les neutrophiles, mais son expression a également été détectée dans le cerveau, les reins, le placenta et les muscles squelettiques (83, 87). Les premières études visant à évaluer les activités biologiques du CLCF1 ont d'abord permis de démontrer un fort potentiel neurotrophique de la cytokine sur les neurones moteurs et un effet prolifératif des lymphocytes B de la rate, expliquant ainsi les autres dénominations de cette cytokine.

### 1.8.2. Les récepteurs de CLCF1

La structure tridimensionnelle du CLCF1 lui confère trois sites de liaison possible avec des chaînes de récepteur. Les travaux du Dr Elson ont montré que les rôles neurotrophiques du CLCF1 sont médiés par l'entremise de l'activation du récepteur au CNTF (CNTFR) (85). En effet, le premier site de liaison de CLCF1 permet le recrutement de la chaîne CNTFR $\alpha$ , alors que le site 2 permet la liaison au CBD de gp130 et le site 3 recrute l'Immunoglobuline-like domaine de LIFR $\beta$ . De manière intéressante, la mutation d'un seul acide aminé du site de liaison 1 à la position 94 (W94A) est suffisante pour inhiber la liaison de la cytokine à son récepteur principal (88). Contrairement au CNTF, CLCF1 ne semble pas posséder la capacité de lier le récepteur au LIF sans la présence d'une chaîne réceptrice alpha (89). L'activation du CNTFR par CLCF1 entraîne l'hétérodimérisation des chaînes LIFR $\beta$  et gp130 induisant l'activation de JAK1 et 2, la phosphorylation de STAT1 et STAT3 et subséquemment la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (85). En plus de la voie JAK-STAT3, très commune aux cytokines de la famille de l'IL-6, CLCF1 a également été démontré pour activer les voies de signalisation JAK-STAT1, PI3K et MAPkinases (85, 89).

L'hypothèse de l'existence d'un second récepteur pour CLCF1 a été mise de l'avant lors de la démonstration de la liaison de CLCF1 sur les lymphocytes B alors que ces cellules immunes n'expriment pas le CNTFR $\alpha$  (90). Dans les dernières années, le laboratoire de C.M. Petersen a identifié un nouveau récepteur potentiel pour le CLCF1 en observant une affinité significative entre cette cytokine et la Sortiline (75). Ces recherches suggèrent, mais ne démontrent pas directement que la Sortiline pourrait agir comme chaîne réceptrice alpha pour le CLCF1 et le CNTF facilitant ainsi la dimérisation des chaînes LIFR $\beta$  et gp130 (75). Les activités biologiques de CLCF1 découlant de sa liaison avec la Sortiline ne sont toutefois pas encore connues. Une interaction similaire entre le complexe CRLF1/CLCF1 et le récepteur SorLA a été identifiée récemment, suggérant que CLCF1 pourrait signaler par l'entremise d'une interaction avec plus d'un récepteur de cette famille (91, 92).



### 1.8.3. Les fonctions biologiques de CLCF1

Bien que CLCF1 possède une structure et des fonctions similaires aux autres cytokines de la famille de l'IL-6, cette cytokine possède des caractéristiques non redondantes particulières nous permettant de stipuler des rôles importants pour cette protéine. En effet, le CLCF1 possède un degré de conservation exceptionnel à travers les espèces, par exemple 96% d'identité et 98% d'homologie entre le CLCF1 murin et humain. Singulièrement, la protéine mature du CLCF1 humain ne diffère du CLCF1 murin que par 3 a.a. Il s'agit du degré de conservation le plus important dans cette famille de cytokines où l'on retrouve par exemple 40% d'homologie de séquence entre l'IL-6 murin et humain. Ce degré de conservation sous-entend une forte pression évolutive sur la cytokine qui pourrait s'expliquer par d'importants rôles non redondants du CLCF1. De manière surprenante, l'homologie de séquence s'observe également au niveau de l'ADN, dans les exons comme dans les introns. Les séquences considérées comme non codantes subissent donc également une pression de conservation. Les raisons de la conservation de ces introns demeurent encore inexpliquées. L'hypothèse de rôles non redondants essentiels de CLCF1 est également supportée par le fait que contrairement aux souris déficientes pour les gènes codant pour l'IL-6, le LIF ou le CNTF, les souris *CLCF1*<sup>-/-</sup> ne sont pas viables, elles décèdent en phase néonatale à jour 1 ou 2 après la naissance (93).



CLCF1 est une des cytokines les moins étudiées de cette famille de cytokine (94), les connaissances sur ses fonctions biologiques sont donc limitées. Les deux prochaines sections tenteront de résumer brièvement les activités biologiques de CLCF1 rapportées chez la souris et chez l'humain.

CLCF1 a d'abord été identifié pour son rôle immunostimulant envers les lymphocytes B. Les travaux de G. Senaldi ont en effet démontré que des injections intrapéritonéales de CLCF1 pendant 7 jours consécutifs chez la souris BALB/c résultaient en une altération importante des organes lymphoïdes secondaires (83). Les souris traitées avec la cytokine exhibaient une hyperplasie folliculaire importante des centres germinaux. Cette hyperplasie était corrélée avec une augmentation significative du nombre de lymphocytes B. De plus, les souris injectées avec du CLCF1 présentaient des taux sériques plus élevés d'IgG et d'IgM que les souris contrôles (83). Dans cette même étude, une administration de CLCF1 a suffi à mener à une augmentation marquée de sérum amyloïde A, d'IL-6 et de corticostéroïde dans le sang, suggérant un rôle de CLCF1 similaire aux cytokines de famille de l'IL-6 dans la régulation de la réaction inflammatoire aiguë (83).

Similairement à l'injection de la cytokine recombinante, la surexpression de CLCF1 dans des souris transgéniques (dont l'expression de la cytokine est contrôlée au niveau hépatique par le promoteur d'apoE) supporte les rôles hyperplasiques de CLCF1 (95). En effet, les souris surexprimant CLCF1 présentaient une expansion des cellules B folliculaires de la rate et une quantité plus élevée de plasmocytes. De taux élevés d'IgM, d'IgA et d'IgE et de faibles taux d'IgG2a et d'IgG3 ont été observés chez les souris transgéniques, suggérant un rôle de la cytokine dans la promotion d'une réponse immunitaire de type Th2 (95).

Des fonctions neurotrophiques de CLCF1 ont également été identifiées chez les rongeurs ainsi que dans divers modèles animaux. *In vitro* et *in ovo*, CLCF1 favorise la survie des neurones moteurs embryonnaires de poulet (96). L'administration de CLCF1 dans les embryons de poulet entre les jours embryonnaires E5 à E9 a permis d'augmenter de 35% la quantité de motoneurones lombaires, sans toutefois réguler la survie des neurones brachiaux ou thoraciques (96). Ceci suggère un rôle anti-apoptotique de CLCF1 spécifique à certaines régions. De

manière concordante, la délétion du partenaire de sécrétion de CLCF1, le CRLF1, a induit chez la souris une réduction de 26% des neurones moteurs lombaires (96). Chez les souris sauvages, des expériences d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont pu démontrer la présence conjointe de CLCF1 et de CRLF1 dans les muscles squelettiques lors de la période embryonnaire pendant laquelle survient l'apoptose des neurones moteurs, suggérant que la source de CLCF1 proviendrait des cellules musculaires (96). CLCF1 est également synthétisé par les cellules neuroépithéliales des fœtus murins, la production de CLCF1 par ces cellules a notamment été démontrée comme importante dans la différenciation des astrocytes de souris (97).

Il a également été montré que CLCF1 protège les cellules ganglionnaires de la rétine *in vivo* dans deux modèles murins de dommage neuronal de la rétine (98). Les fonctions neurotrophiques de CLCF1 ont par la suite été confirmées par l'étude des souris déficientes pour la cytokine. Il a été suggéré que la létalité associée à la mutation de CLCF1 proviendrait d'un défaut de déglutition chez les souriceaux menant à une absence d'alimentation. Ce défaut de succion et d'alimentation a également été observé chez les souris *CNTFR $\alpha$ <sup>-/-</sup>* (défaut dans la signalisation de CLCF1) ainsi que chez les souris *CRLF1<sup>-/-</sup>* (défaut dans la sécrétion de CLCF1) (99, 100). L'inactivation de CLCF1 chez la souris provoque une hypoplasie majeure des neurones moteurs faciaux : on observe une diminution de 32% du nombre de neurones dans le noyau facial ainsi qu'une diminution de 29% des neurones de la corne ventrale lombaire (93).

Une étude plus récente a également démontré un rôle pour CLCF1 dans le contrôle de l'activité locomotrice en fonction du rythme circadien (101). Les travaux du Dr Kraves suggèrent que CLCF1 possède certaines caractéristiques particulières aux protéines responsables de la régulation du rythme circadien. Chez la souris, CLCF1 est exprimé dans des régions du cerveau connues pour réguler le rythme circadien, notamment dans les neurones à vasopressine du système nerveux central (101). De plus, CLCF1 arbore un niveau d'expression variable durant la journée, l'expression de la cytokine étant plus élevée durant le jour, période où l'activité locomotrice est la plus basse chez le rongeur. L'injection intracrânienne de CLCF1 chez les hamsters résulte en une baisse significative de l'activité locomotrice comparativement aux contrôles. À l'inverse, l'infusion hypothalamique d'un anticorps neutralisant la signalisation de

gp130 au pic d'expression de CLCF1 produit une augmentation du temps d'activité journalière des rongeurs (101).

Une accumulation d'évidences suggère des rôles immunomodulateurs pour CLCF1 autres que la régulation de la prolifération et la différenciation des cellules B. De manière intéressante, CLCF1 possède la capacité d'induire la prolifération de la lignée myéloïde leucémique M1, un effet opposé à celui de son homologue LIF qui a été démontré pour inhiber la prolifération des cellules de cette lignée (83). De plus, comme le CNTF, CLCF1 est en mesure de moduler la formation osseuse en régulant la différenciation des ostéoblastes (94, 102). Dans la dernière année, une diminution du taux d'expression de l'ARNm de CLCF1 a d'ailleurs été identifiée dans des patientes souffrant d'une forme particulière d'ostéoporose postménopausale (103). Dans cette étude, un traitement de 3 et 6 mois aux Liuwei Dihuang Pill a mené à une augmentation considérable de l'expression de CLCF1 ainsi qu'une augmentation de la densité osseuse (103). Ces observations sous-entendent un rôle pour la cytokine dans la promotion de la formation osseuse.

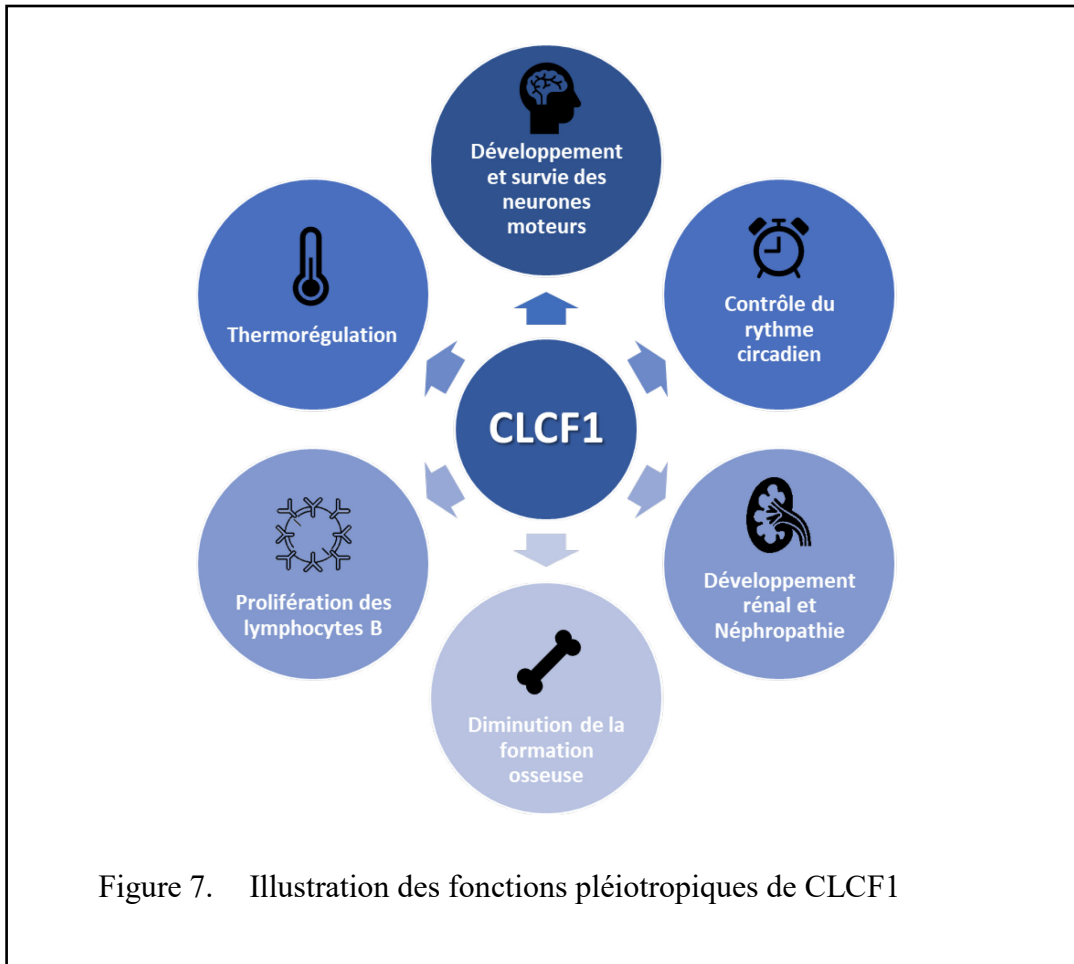
Des niveaux d'expression d'ARNm élevé de CLCF1 ont été associés au cancer des poumons à larges cellules (104). Effectivement, des échantillons de cellules cancéreuses de poumons humains ont été analysés pour déterminer l'existence de biomarqueurs potentiels. Les niveaux de différents marqueurs, dont le CLCF1, le LIF et l'IL-6, ont été identifiés comme surélevés dans ces échantillons par rapport aux cellules pulmonaires saines. Les fibroblastes du milieu tumoral semblent être responsables de la synthèse du CLCF1. La co-injection de fibroblastes surexprimant CLCF1 et de cellules cancéreuses chez la souris a mené au développement de tumeurs considérablement plus larges comparativement à l'injection de fibroblastes contrôles surexprimant LacZ (104). Ces données suggèrent un rôle délétère de la cytokine dans la progression du cancer du poumon.

Toujours dans les poumons, CLCF1 a également été démontré pour favoriser le recrutement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans un contexte de fibrose pulmonaire (105). L'administration du complexe CLCF1/CRLF1 a eu pour effet d'augmenter l'accumulation de Th1 et Treg et diminuer l'incidence de fibrose dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par

bléomycine (105). La capacité du complexe CLCF1/CRLF1 à activer les cellules T CD4<sup>+</sup> *in vitro* a par la suite été démontrée par A. Tormo (106).

Les souris déficientes en CLCF1 décèdent très tôt après la naissance rendant ainsi très difficile l'étude des fonctions physiologiques du CLCF1 dans le développement du système immunitaire. Toutefois, des études de caractérisations de la moelle osseuse ont été effectuées sur des souris déficientes en CRLF1. Ces souris, possédant un défaut de sécrétion de CLCF1, exhibent une diminution marquée (2.6 fois moins) du nombre de cellules souches hématopoïétiques (99). Cette observation suggère que CLCF1 a un rôle dans la régulation de l'hématopoïèse et le maintien des cellules souches hématopoïétiques. L'analyse phénotypique des souris hétérozygotes pour CLCF1 (donc manquant un seul allèle de ce gène) indique une diminution significative du nombre de lymphocytes en circulation ainsi qu'une tendance à la baisse du nombre de plaquettes (libre accès [mousephenotype.org](http://mousephenotype.org)). Ces observations supportent donc l'hypothèse que CLCF1 pourrait avoir un rôle dans le développement du système immunitaire.

Les rôles neuroprotecteurs et immunomodulateurs de CLCF1 sont nombreux et semblent essentiels au bon développement du système neuronal et immunitaire. Les phénotypes associés aux mutations des gènes codants pour CLCF1 ou CRLF1 suggèrent toutefois que plusieurs fonctions spécifiques à cette cytokine restent à identifier.



#### 1.8.4. Les syndromes CISS et Crisponi

Chez l'homme, des mutations dans le gène codant pour CLCF1 ou son partenaire de sécrétion CRLF1 sont associées aux syndromes de sueurs à températures froides (CISS, cold-induced sweating syndrome) et de Crisponi respectivement (107). Des mutations dans le gène de CRLF1 engendrent les syndromes CISS1 et Crisponi, alors que les mutations dans CLCF1 sont associées au syndrome CISS2 (107-109). Les syndromes CISS et Crisponi sont très similaires de sorte que plusieurs experts considèrent qu'il s'agit du même syndrome et que Crisponi est la manifestation infantile du syndrome de CISS. CISS et Crisponi sont des syndromes sévères affectant plusieurs organes et systèmes du corps humain. La grande majorité des patients Crisponi décèdent au courant de la première année de vie pendant des épisodes de fortes fièvres (110).

Les patients CISS et Crisponi survivants jusqu'à l'âge adulte ont des dimorphismes et des problèmes marqués au niveau du système nerveux, du métabolisme et du système immunitaire. Ils souffrent entre autres de camptodactylie, de scolioses, et montrent des contractions prononcées du visage (111). Le centre de contrôle de la respiration semble également affecté chez les très jeunes patients (112). De manière similaire aux souris déficientes en CRLF1 ou en CLCF1, la plupart des patients souffrent de problèmes d'alimentation et de déglutition (110). Les observations concordantes entre les souris et l'homme, de même que la forte conservation de séquence entre les deux espèces, laissent sous-entendre que les effets neuroprotecteurs de CLCF1 démontrés par les recherches effectuées sur les rongeurs sont largement transposables à l'homme.

Les patients souffrent également de problèmes de thermorégulation. À des températures ambiantes sous les 18-20 degrés les patients transpirent abondamment au niveau du visage, des bras et du torse. Ce phénomène est aussi observé au contact d'objets froids, en période de stress et au contact du sucre (107). Le déclenchement de telles sudations pourrait être expliqué par un manque d'expression du complexe CLCF1/CRLF1 dans les glandes sudoripares ou d'une différenciation cholinergique défectueuse des neurones sympathiques innervant ces glandes (107). Ces phénotypes impliquent un rôle important de la cytokine dans la thermorégulation.

Les patients ont aussi des phénotypes immunitaires, tels que des éruptions cutanées, des infections récurrentes durant l'enfance ainsi que des épisodes de fièvre stérile (107). De manière intéressante, les manifestations immunitaires de ces syndromes ont été décelées majoritairement en bas âge et ne semblent pas avoir été observées chez l'adulte. Ceci pourrait indiquer un rôle de CLCF1 dans le développement du système immunitaire plutôt que son maintien ou sa régulation.

Jusqu'à présent, une trentaine de patients Crisponi ont été diagnostiqués dont 13 provenant de familles italiennes. Les patients CISS sont également très rares, on compte environ une dizaine de patients identifiés provenant de la Norvège, de l'Australie, d'Israël et du Canada (113). Parmi ces patients, certaines observations non généralisées, mais intéressantes ont été effectuées qui

pourraient aider à identifier des rôles supplémentaires de la cytokine composite. Par exemple, un des patients CISS2 possède une insensibilité à la douleur et à la température (108). Un manque d'appétit marqué a aussi été observé chez certains patients. Un des enfants atteint de CISS1 démontrait une réponse exagérée au son et aux stimuli tactiles. Quatre patients Crisponi ont présenté des anomalies dans les cellules épithéliales de la cornée (114). Un patient Crisponi de 17 ans montre une anomalie au niveau du système urinaire : ce patient ne possède qu'un rein gauche fonctionnel, le droit ayant été décrit comme petit ectopique et non fonctionnel (113). Finalement, des lésions dans la matière blanche sous-corticale ont été observées chez deux frères CISS1 par imagerie à résonance magnétique (115).

Récemment, des mutations hétérozygotes dans le gène *CRLF1* ont été associées à une forme d'achalasia familiale (problème d'alimentation en raison d'un défaut de péristaltisme) (116). Bien que ces mutations n'aient pas causé de syndromes CISS ou de Crisponi, ces patients ont des problèmes d'alimentation et de déglutition similaires à ceux des patients Crisponi et des souris KO pour *CLCF1*. Ces observations renforcent les évidences indiquant des fonctions biologiques du complexe *CLCF1/CRLF1* dans le péristaltisme, mais surtout montrent que la déficience d'un seul allèle de *CRLF1* est suffisante pour engendrer ce type de phénotype.

### **1.8.5. Les rôles de *CLCF1* dans la FSGS**

La glomérulosclérose segmentaire focale (FSGS) est une maladie rénale idiopathique rare pouvant affecter les enfants, les adolescents ainsi que les adultes. La FSGS est une maladie qui se caractérise par la cicatrisation et la perte de fonction des unités de filtrations du rein appelées glomérules (117). L'atteinte des glomérules provoque éventuellement un mauvais fonctionnement rénal qui se traduit par une hyperprotéinurie (une augmentation de la quantité de protéine dans les urines) et de l'insuffisance rénale. Parmi les symptômes observés chez les patients, on dénote des taux anormalement bas d'albumine en circulation, de l'œdème, de l'hypertension et des niveaux de cholestérol élevés (117).

La FSGS peut être primaire ou secondaire. L'étiologie de la forme primaire est encore méconnue alors que la forme secondaire est induite par différentes conditions pathologiques soit l'obésité, des malformations rénales génétiques, certaines infections virales telles que le VIH ou des

maladies auto-immunitaires telles que le lupus. À ce jour, aucun traitement spécifique n'existe pour traiter ou prévenir la FSGS, les traitements de première ligne sont des stéroïdes comme la prednisone afin de contrôler la protéinurie, de la dialyse ou de la plasmaphérèse. Les patients sont aussi enclins à recevoir des transplantations de reins, toutefois il est à noter qu'une grande partie de ces patients redéveloppe la FSGS après la greffe rénale (118).

Certaines observations cliniques et résultats de recherche permettent de supposer que ce syndrome néphrotique primaire est dû à la présence de facteurs circulants délétères appelés facteurs de perméabilité. Par exemple, la plasmaphérèse chez les patients est bénéfique pour ralentir la progression de la maladie. La récurrence de la FSGS post-transplantation est également une indication de l'existence de facteurs causals extrinsèques aux reins. Des études chez la souris ont également démontré que l'infusion de plasma provenant de patients FSGS chez le rongeur induisait le développement d'une protéinurie détectable par la présence d'albumine dans les urines (118).

Le laboratoire du Dr Savin à Kansas City étudie actuellement les rôles de CLCF1 comme facteur de perméabilité potentiel dans le FSGS. Cette hypothèse découle des résultats d'études de cohortes comparant le sérum de patients FSGS au sérum de patients sains. Des petites concentrations de CLCF1 ont été observées par LC-MS/MS dans le sérum des patients FSGS alors que cette cytokine n'a pas été détectée dans le groupe contrôle (119). De plus, *in vitro*, le CLCF1 a la capacité d'augmenter la perméabilité des podocytes à l'albumine. De manière surprenante, le complexe CLCF1/CRLF1 semble avoir des fonctions inverses au CLCF1 en diminuant la perméabilité des podocytes de rat en culture (119). À ma connaissance, il s'agit de la première évidence démontrant un rôle opposé entre CLCF1 et la cytokine composite CLCF1/CRLF1. Une administration répétée de CLCF1 recombinant chez la souris a résulté en une augmentation de la phosphorylation des STAT dans le cortex rénal ainsi qu'une augmentation de la quantité d'albumine dans l'urine des souris (120). Dans cette étude, les auteurs ont également démontré un effet important de la cytokine sur le remodelage du cytosquelette des podocytes en cultures (120). Ces évidences suggèrent un rôle potentiel de CLCF1 dans le développement ou encore dans la progression de la FSGS.



## **2. L'Hématopoïèse**

### **2.1. L'hématopoïèse embryonnaire**

L'hématopoïèse est un terme désignant le processus de formation de toutes les composantes du sang, celle-ci inclut donc la formation et le renouvellement des cellules du système immunitaire. Chez l'homme, ce processus débute au stade embryonnaire. Il existe en effet deux vagues d'hématopoïèse embryonnaire: l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive (121). L'hématopoïèse primitive débute dès les premières semaines de gestation dans le sac vitellin qui entoure l'embryon. Cette première phase est responsable de la formation des premiers érythrocytes immatures ainsi que la production de macrophages résidents et certains mégacaryocytes (122). L'hématopoïèse définitive quant à elle, se produit majoritairement dans l'embryon. Elle est responsable de la myélopoïèse et de la lymphopoïèse donnant naissance aux nombreuses lignées de cellules immunes observables chez l'adulte (121). L'hématopoïèse définitive débute brièvement dans la région para-aortique ainsi qu'autour des artères vitellines, mais les premières cellules souches hématopoïétiques (CSH) migrent rapidement vers le foie fœtal (123-125). Une grande partie de l'hématopoïèse embryonnaire se produit dans le foie fœtal, cette étape dure généralement six semaines et permet l'expansion et la différenciation des CSH. Vers le milieu de la dixième semaine de gestation, les CSH migreront du foie vers la moelle osseuse et les organes lymphoïdes où se produira la très grande majorité de l'hématopoïèse chez l'homme (126). Chez la souris, l'hématopoïèse définitive débute dans la région aorto-gonado-mésonephros à jour embryonnaire 10.5 alors que la colonisation du foie fœtal se produit à jour embryonnaire 14.5 et les CSH migrent finalement vers la moelle osseuse à jour embryonnaire 18.5 (127).

L'hématopoïèse primitive réalisée dans le sac vitellin est responsable de la formation des cellules myéloïdes résidentes dans les tissus (128). Il s'agit entre autres du site de production de la microglie, des cellules de Langerhans, des cellules de Kupffer et des macrophages alvéolaires des poumons. Les macrophages résidents possèdent une appellation spécifique en fonction de

leur localisation dans l'organisme. Ces cellules partagent toutefois une fonction principale commune qui est la phagocytose (129). Les macrophages résidents ont pour fonctions d'éliminer les débris ainsi que les corps nécrotiques, les corps apoptotiques et les pathogènes. En présence d'infection, les macrophages résidents sont en mesure d'induire le recrutement de neutrophiles et de monocytes circulants (130). À l'exception des macrophages alvéolaires, ce type de macrophage ne semble pas être renouvelé par les CSH adultes (131). Les macrophages résidents des tissus ne proviennent donc pas des cellules souches hématopoïétiques adultes, mais proviennent plutôt de progéniteurs érythromyéloïdes présents dans le sac vitellin(128). Les progéniteurs érythromyéloïdes diffèrent des CSH; par exemple, ces progéniteurs ne dépendent pas du facteur de transcription Myb<sup>4</sup> essentiel aux CSH et contrairement à celles des CSH, la transplantation de ces progéniteurs ne mène pas à la reconstitution du système immunitaire (128).

## **2.2. L'hématopoïèse adulte**

L'hématopoïèse adulte se déroule principalement dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules myéloïdes et les lymphocytes B se développent dans les niches hématopoïétiques de la moelle osseuse alors que les lymphocytes T sont formés dans le thymus (1). La production de chacune des lignées de cellules immunes est organisée de manière hiérarchique avec les CSH au sommet, qui garantissent par le biais de la production de progéniteurs multipotents et engagés la production continue de toutes les différentes cellules sanguines (132). L'hypothèse classique de l'hématopoïèse hiérarchique peut s'illustrer en trois générations où les CSH donnent d'abord naissance à des progéniteurs multipotents qui eux produisent de cellules pluripotentes (ou oligopotentes) restreintes à une lignée cellulaire particulière. Subséquemment, ces cellules produisent des progéniteurs unipotents qui vont maturer en un type cellulaire unique (132). Il s'agit d'une série de processus strictement régulés sous l'influence de divers médiateurs solubles, de protéines transmembranaires, de molécules d'adhésions et de l'activation d'une combinaison spécifique de facteurs de transcription. En lien avec les résultats présentés dans cette thèse, ce chapitre abordera les principales étapes impliquées dans la formation et la production des monocytes et des macrophages.

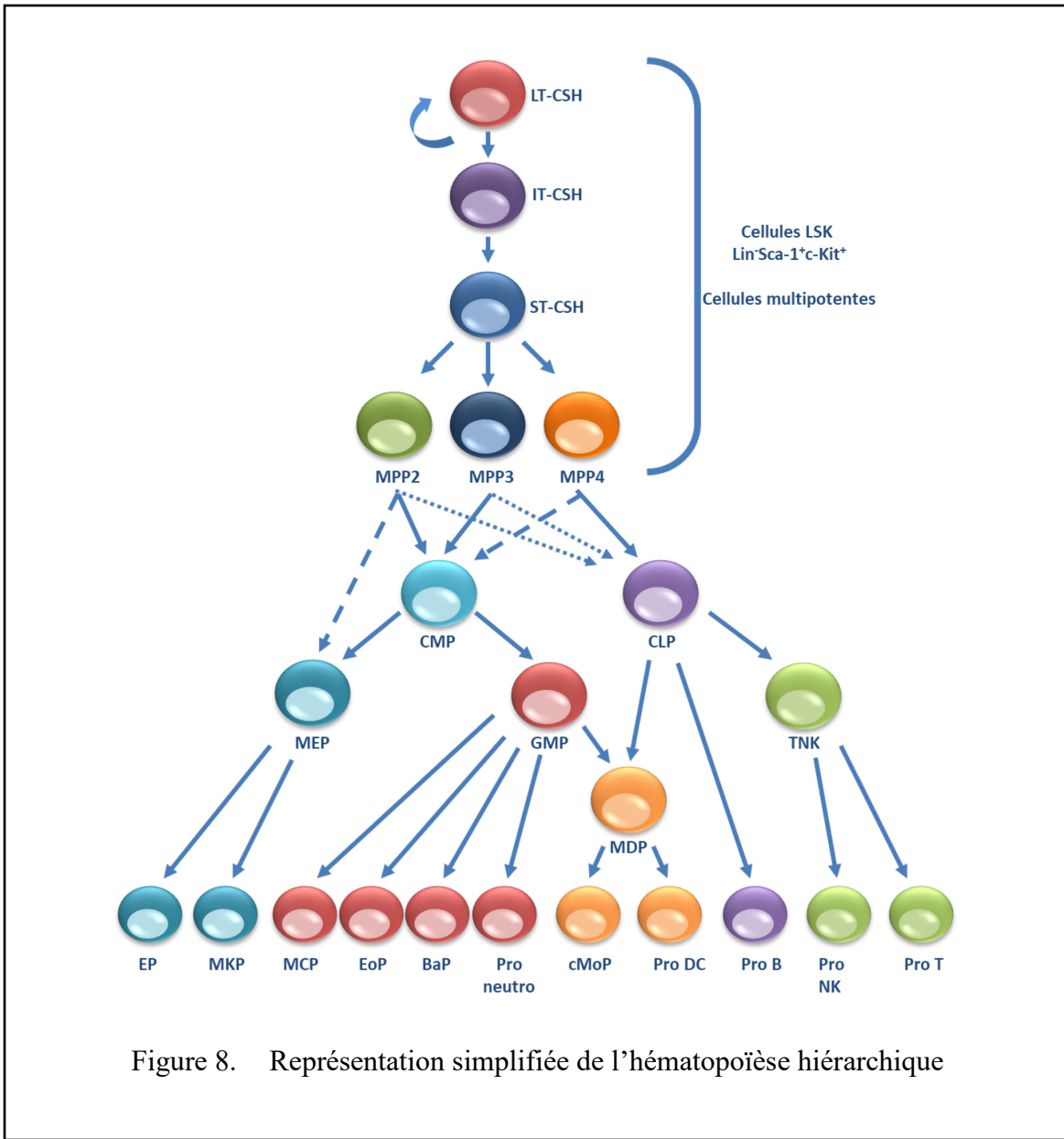
### 2.3. Les cellules souches hématopoïétiques

Selon l'hypothèse d'une hématopoïèse hiérarchique, les CSH sont au sommet de la pyramide hématopoïétique et exhibent la capacité de former un système immunitaire complet. Classiquement, les CSH sont divisées en 2 sous-types selon leur capacité d'autorenouvellement : les CSH longs-terme (LT-CSH) et les CSH courts-terme (ST-CSH). Les LT-CSH consistent en un petit réservoir de cellules capables de renouveler efficacement et à long terme le système immunitaire dans un organisme immunodéprimé (133, 134). Ces cellules ont une grande capacité d'autorenouvellement puisqu'elles sont responsables du maintien d'une réserve cellulaire capable de reconstituer le système en cas de besoin. En état d'homéostasie, les LT-CSH sont habituellement quiescentes et n'entre en phase de réplication que sous l'effet d'un signal de stress (135). Les ST-CSH quant à elles sont en mesure de reconstituer rapidement les cellules immunes, mais n'ont pas la capacité de maintenir cette reconstitution à long terme (136). Ceci suggère un autorenouvellement plus limité pour le ST-CSH comparativement aux LT-CSH. Récemment, des cellules souches transitoires exhibant une capacité d'autorenouvellement intermédiaire entre les LT-CSH et les ST-CSH ont été décrites par le laboratoire de N. Iscove créant ainsi une troisième classe de CSH, les IT-CSH (137). Les ST-CSH en se divisant produisent une série de progéniteurs multipotents (MPP) qui sont classifiés en sous-population selon leur phénotype et leur prédisposition à former certains types cellulaires. Par exemple, les MPP2 et MPP3 donnent naissance préférentiellement à des cellules myéloïdes alors que les MPP4 (aussi appelés LMPP pour *Lymphoid-primed MPP*) favorisent la production de lymphocytes (138). Les MPP sont des acteurs clés de l'hématopoïèse puisqu'ils sont responsables de balancer la production de cellules immunes dans un contexte d'homéostasie.

Chez la souris, les LT-CSH, ST-CSH et MPP peuvent être reconnues par immunophénotypage à l'aide de marqueurs de surfaces spécifiques. D'abord, l'ensemble des cellules multipotentes n'expriment aucun marqueur de surface caractéristique des lignées cellulaires immunes (par exemple : CD11b, CD3, CD19, etc.), elles sont donc dites *lineage negative* ( $Lin^-$ ). Les cellules multipotentes expriment également à leur surface les récepteurs CD114 (aussi appelé c-Kit) et Ly6AE (ou Sca-1). Ainsi, l'ensemble des LT-CSH, ST-CSH et MPP sont souvent désignées sous l'appellation  $Lin^-Sca-1^+c-Kit^+$  ou LSK (139). Les LSK constituent une population

hétérogène de cellules représentant l'ensemble des cellules immunitaires pluripotentes de l'organisme. Ultérieurement, les différentes populations formant les LSK peuvent être distinguées à l'aide des marqueurs de la famille des SLAM, notamment selon l'expression de surface de CD48 et CD150 (140). Les LT-CSH sont définies comme des cellules  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^-$ , les ST-CSH pour leur part sont  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD150}^- \text{CD48}^-$ , les MPP2 sont  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD150}^+ \text{CD48}^+$ , alors que les MPP3/4 sont  $\text{Lin}^- \text{Sca1}^+ \text{cKit}^+ \text{CD150}^- \text{CD48}^+$  (138). La distinction entre les MPP3 et les MPP4 peut être effectuée par l'entremise d'un marquage pour FLT3, les MPP3 sont  $\text{Flt3}^-$  alors que les MPP4 sont  $\text{Flt3}^+$  (138).

La description des CSH effectuée dans les paragraphes précédents est basée sur le dogme traditionnel d'hématopoïèse selon lequel les LT-CSH sont considérées comme une population entièrement homogène de cellules. Ces dernières années, grâce à l'avancée des techniques de protéomique et d'isolation cellulaire, plusieurs données ont été publiées suggérant une hétérogénéité de ces cellules souches (132, 141). Ainsi, les CSH posséderaient primitivement une certaine prédisposition envers un destin cellulaire défini contrairement à ce qui avait été avancé dans le modèle classique. Ainsi, le modèle d'hématopoïèse modernisé relate plutôt d'un continuum d'états transitoires de différenciation ajoutant un niveau de complexité à l'étude des processus hématopoïétiques (132).



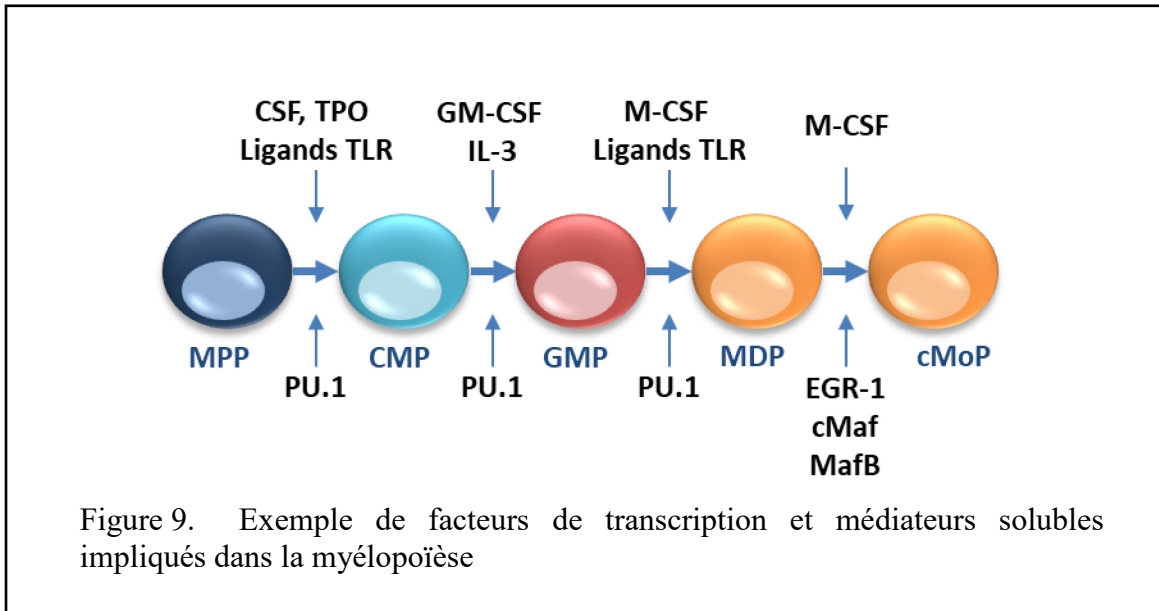
## 2.4. La myélopoïèse

En aval de l'activation des CSH et la production de MPP, débute les processus de différenciations hématopoïétiques menant à la production de progéniteurs oligopotents et plus tard à la génération de progéniteurs engagés. Les progéniteurs pluripotents et engagés exhibent une prolifération diminuée par rapport aux cellules LSK, mais possèdent une capacité de différenciation beaucoup plus élevée.

Les MPP peuvent se diviser en deux sous-populations de progéniteurs communs: les progéniteurs communs des cellules myéloïdes (CMP) et les progéniteurs communs des lymphoïdes (CLP) (142, 143). La présence d'IL-7 ainsi que l'augmentation de l'expression de surface d'IL-7R $\alpha$  sont essentielles à la production des CLP. Ces cellules sont responsables de la production de lymphocytes B, T et NK (142). Les CMP pour leur part sont généralement produits en présence de *stem cell factor* (SCF), d'IL-6, de ligands TLR, et d'autres facteurs de croissance (143). Une forte expression du facteur de transcription PU.1 est aussi très importante pour la formation des CMP, alors que l'expression des facteurs EBF1 et NOTCH favorisait plutôt un engagement vers les lymphocytes B et T (144-146).

Les CMP sont ensuite divisés en deux sous-types de progéniteurs cellulaires sous l'influence de certains médiateurs solubles. Par exemple, en présence d'IL-3 et de SCF, les CMP peuvent se différencier en progéniteurs de mégacaryocyte et d'érythrocytes (MEP). En présence d'IL-3 et de GM-CSF, les CMP donneront plutôt naissance à des progéniteurs de monocytes et de granulocytes (GMP). La différenciation des CMP vers les MEP ou les GMP est également dépendante des niveaux d'expression des facteurs de transcription PU.1 et de GATA-1 (147). Les MEP et les GMP peuvent être distingués chez la souris par immunophénotypage selon l'expression du récepteur Fc $\gamma$ II/III (143).

Les GMP sont les précurseurs directs des progéniteurs unipotents de l'ensemble des granulocytes et mènent donc à la production des précurseurs des mastocytes, neutrophiles, basophiles et éosinophiles. Le destin cellulaire des granulocytes dépend entre autres des taux d'IL-5, de G-CSF, de m-CSF et des ligands du TLR présents dans les niches hématopoïétiques. Les monocytes et cellules dendritiques myéloïdes (mDC) quant à elles sont issues d'un intermédiaire supplémentaire appelé précurseur des monocytes/macrophages et des mDC (MDP). La formation des monocytes est favorisée par l'expression du facteur de transcription PU.1 alors que l'expression de CEBP $\alpha$  engendre préférentiellement la granulopoïèse (148). Dans les MDP, une expression élevée du facteur de transcription de PU.1 a été suggérée pour générer les DC (145). L'expression intermédiaire du facteur de transcription de PU.1 accompagnée de l'expression des facteurs de transcription EGR-1 et c-Maf et MafB dans les MDP favorisera la production de monocyte et macrophages (145, 147).



## 2.5. Les cytokines de la famille de l'IL-6 dans l'hématopoïèse

### 2.5.1. L'IL-6

Les cytokines de la famille de l'IL-6 jouent des rôles prépondérants dans l'hématopoïèse. Ces fonctions sont notamment observables par l'étude des souris déficientes pour la chaîne gp130 commune à toutes les cytokines de cette famille. La délétion de la chaîne gp130 chez la souris induit le décès des embryons à partir du jour embryonnaire 12.5 jusqu'à terme (23). Des lacunes importantes du système hématopoïétique sont observables chez les embryons. En effet, les souris gp130<sup>-/-</sup> exhibent moins de CSH, de progéniteurs érythroïdes et de progéniteurs de granulocytes dans le foie fœtal à jour 13.5 (23). On compte également moins de cellules T dans le thymus embryonnaire de ces souris. De manière intéressante, le nombre de cellules mononuclées dans le foie des embryons est significativement diminué à la fois chez les souris gp130<sup>+/-</sup> et les souris gp130<sup>-/-</sup> suggérant que la délétion d'un seul allèle de gp130 est suffisante pour affecter le développement de cellules immunes (23).

Au début des années 1990, le laboratoire de T. Kishimoto a démontré la capacité de l'IL-6 à promouvoir la prolifération des CSH *in vitro* en présence d'IL-3 (149). L'IL-6 est produite par les cellules immunes et les cellules stromales mésenchymateuses (MSC) présentes dans les niches hématopoïétiques. La sécrétion d'IL-6 par les MSC est un facteur important dans le maintien de la pluripotence des CSH et dans la production de cellules souches myéloïdes (150). La déplétion d'IL-6 chez la souris mène à une diminution significative du nombre de progéniteurs hématopoïétiques engagés ainsi qu'une forte réduction du nombre d'unités formant des colonies (151). Ces résultats, comparables à ceux observés chez la souris déficiente en gp130, suggèrent un rôle prépondérant pour l'IL-6 dans le maintien ou la survie des CSH. Chez l'homme, les CSH provenant du sang de cordon ombilical répondent à l'IL-6 engendrant une activation rapide de la voie de signalisation JAK-STAT3, ainsi qu'une activation plus tardive d'AKT, de STAT1 et de STAT5 (152). L'IL-6, en combinaison avec l'IL-3 et d'autres facteurs de croissance, est largement utilisée comme molécule de stimulation pour favoriser l'expansion des CSH humaines en culture (153, 154).

### **2.5.2. Le LIF**

Le LIF est une cytokine dont les rôles dans le développement et l'embryogenèse ont été largement décrits. Les fonctions du LIF dans le développement du système immunitaire semblent toutefois plus restreintes. Alors que les souris LIF<sup>-/-</sup> exhibent moins de CSH dans la moelle osseuse, la déplétion de cette cytokine ne semble pas affecter le nombre de progéniteurs ou la quantité de cellules immunes en circulation. *In vitro*, le LIF n'est pas en mesure d'induire à lui seul la prolifération des CSH. Cependant, la stimulation des CSH avec un mélange de LIF et d'IL-3 favorise l'expansion et la différenciation des mégacaryocytes (25). De manière concordante, l'injection de LIF chez la souris et chez le singe provoque l'amplification du nombre de mégacaryocytes dans la moelle ainsi qu'une augmentation dose-dépendante du nombre de plaquettes en circulation (155, 156). Les effets thrombopoïétiques du LIF sont tels que l'administration de la cytokine recombinante a significativement diminué la thrombocytopénie chez les singes dans un modèle d'aplasie médullaire (155). Chez l'homme, une étude de phase I a démontré un effet bénéfique de l'injection de LIF humain recombinant sur la reconstitution des plaquettes et des neutrophiles après chimiothérapie (157).



## **3. Les lipoprotéines et les apolipoprotéines**

### **3.1. Le métabolisme des lipides et du cholestérol**

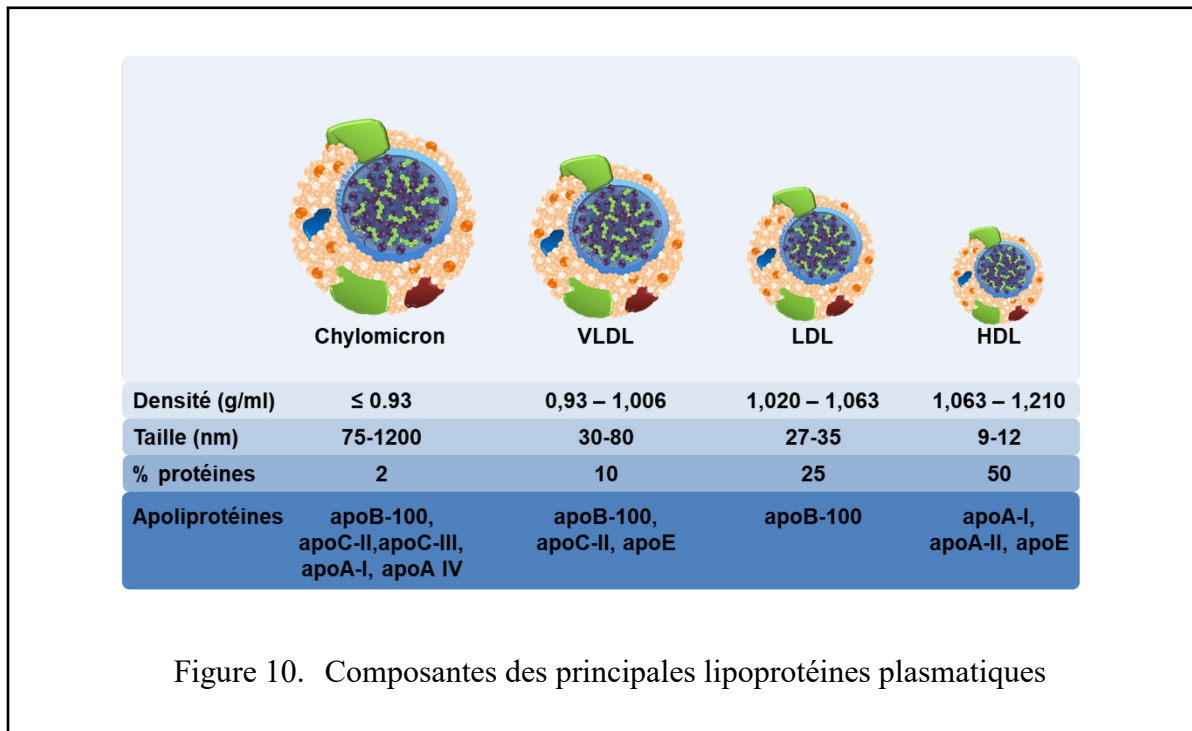
Le métabolisme est défini comme l'ensemble des réactions biochimiques responsables de transformer les nutriments en énergie et composantes structurales pour le bon fonctionnement des cellules. Provenant de l'alimentation, les lipides sont d'abord transformés en micelles dans le duodénum à l'aide d'acides biliaires et de la lipase pancréatique. Les entérocytes de l'intestin grêle absorbent ces micelles pour les reconvertir en cholestérol, phospholipides et en triglycérides (158). Ces éléments sont ensuite enveloppés par de nombreuses protéines du réticulum endoplasmique puis relâchés dans le réseau lymphatique sous forme de lipoprotéines appelées chylomicrons. Les lipoprotéines sont des structures sphériques composées de lipides et de protéines permettant la solubilité et le transport des lipides hydrophobes (158). La surface externe des lipoprotéines est constituée de protéines amphipatiques (les apolipoprotéines), de phospholipides et de cholestérol non estérifié alors que l'intérieur des lipoprotéines est riche en triglycérides et en cholestérol estérifié (158).

Dans la circulation sanguine, les chylomicrons subissent une série de réarrangements afin d'atteindre le système hépatique. Les chylomicrons interagissent d'abord avec les HDL circulant pour échanger leur apoA-I et acquérir l'apoE et l'apoC (158). La présence d'apoC sur les chylomicrons permet aux lipoprotéines d'interagir avec la lipoprotéine lipase. Cette enzyme est présente dans la circulation, à la surface des cellules musculaires et sur les adipocytes, elle permet la digestion des triglycérides en acide gras libre (159). Les acides gras contrairement aux triglycérides ont la capacité de diffuser dans les muscles où ils agissent comme source d'énergie et à travers les adipocytes pour leur entreposage. L'hydrolyse des triglycérides a pour effet de réduire la taille des chylomicrons ce qui permet ensuite leur transport vers le réseau hépatique. Les chylomicrons sont internalisés par les hépatocytes à l'aide des récepteurs aux LDL (LDLR) ou des récepteurs aux protéines reliés aux lipoprotéines (LRP) et le contenu lipidique des chylomicrons est hydrolysé (158).

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont formées par le foie. Les acides gras libérés par l'hydrolyse des chylomicrons dans les hépatocytes constituent des substrats pour la lipogenèse hépatique (160). Les lipides et le cholestérol du réticulum endoplasmique s'associent alors avec l'apoB-100 et les phospholipides formant les VLDL. Les VLDLs sont transportés via le Golgi et sécrétés dans la circulation (160).

De manière similaire aux chylomicrons, les VLDL relarguent leur contenu en triglycérides dans les muscles et les adipocytes par l'entremise de la lipoprotéine lipase. Les VLDLs déplétés en triglycérides deviennent ainsi des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), puis des lipoprotéines de faible densité (LDL) (161). Les LDL seront captés par les cellules périphériques via les récepteurs aux LDL pour transmettre aux cellules et aux organes cibles leur contenu en cholestérol.

Le cholestérol libre peut au besoin être sécrété des cellules et dirigé vers le foie grâce à la présence de lipoprotéines de haute densité (HDL). L'efflux de cholestérol est rendu possible par un transport inverse via une interaction du cholestérol avec les transporteurs ABCA1 ou ABCG1 et dans une moindre mesure avec le récepteur éboueur B1 (SR-B1) (162). Une fois dans les HDL, le cholestérol est estérifié par la léthicine-cholestérol acyltransférase (LCAT). L'estérification du cholestérol est nécessaire pour diriger le cholestérol à l'intérieur de la lipoprotéine, laissant de la place à la surface pour collecter plus de cholestérol (162). Les HDL sont récupérés par les hépatocytes grâce à la présence de SR-B1. Dans le foie, le cholestérol subit un processus de dé-estérification puis est sécrété vers la bile pour y être excrété (162).



## 3.2. Les apolipoprotéines

### 3.2.1. Caractéristiques générales des apolipoprotéines

Les apolipoprotéines sont des glycoprotéines amphipatiques présentes dans les lipoprotéines qui assurent le transport des lipides et du cholestérol (159). Les apolipoprotéines coordonnent la formation et la solubilisation des lipoprotéines. Ces molécules sont essentielles au métabolisme des lipides, mais possèdent également des rôles importants dans la régulation du système nerveux, l'inflammation, l'hématopoïèse et la signalisation cellulaire (163-166). Il existe plusieurs sortes d'apolipoprotéines dont la structure, les fonctions enzymatiques et les récepteurs diffèrent. Ces protéines sont classées en familles selon leur degré d'homologie de séquence (159). Il existe à ce jour plus d'une dizaine de ces apolipoprotéines: apoA (I, II et IV), apoB (48, 100), apoC (I, II, III), apoD, apoE, apoH, apoJ, apoL et apoM.

### 3.2.2. Les différentes apolipoprotéines

L'apoA comprend trois isoformes : l'apoA-I, l'apoA-II et l'apoA-IV. Cette classe d'apolipoprotéines est d'abord exprimée dans les chylomicrons, mais se retrouve très rapidement échangée vers les HDL dans la circulation. C'est donc dans les lipoprotéines de haute densité que l'on retrouve plus particulièrement l'apoA. Notamment, l'apoA-I qui représente jusqu'à 65% de la composante protéique des HDL et l'apoA-II 20% (167, 168). L'apoA-I comprend des fonctions enzymatiques importantes. Par exemple, elle contribue à l'estérification du cholestérol en agissant comme cofacteur pour la LCAT (169). Cette apolipoprotéine favorise également l'efflux de cholestérol des cellules périphériques en activant le transporteur ABCA1 (170). Grâce à son effet favorable sur le transport inverse du cholestérol, des niveaux élevés d'apoA-I chez l'humain sont associés à un risque diminué de développer des maladies cardiovasculaires (171). L'apoA-II se trouve dans les HDL principalement sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères avec l'apoD (172). Ses rôles physiologiques semblent moins bien compris que ceux de l'apoA-I. Toutefois l'analyse des souris KO pour apoA-II suggère par exemple des fonctions pour cette apolipoprotéine dans le métabolisme des acides gras libres (173). La déplétion d'apoA-II est aussi corrélée avec un niveau plus faible de VLDL et d'insuline (172). Contrairement aux deux premières apoA, qui sont principalement synthétisées par les hépatocytes, l'apoA-IV est produit exclusivement par les cellules de l'intestin (174). L'apoA-IV, présente dans les chylomicrons et les HDL, induit l'activation de la lipoprotéine lipase, favorise l'efflux de cholestérol et lie la LCAT et la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) (175).

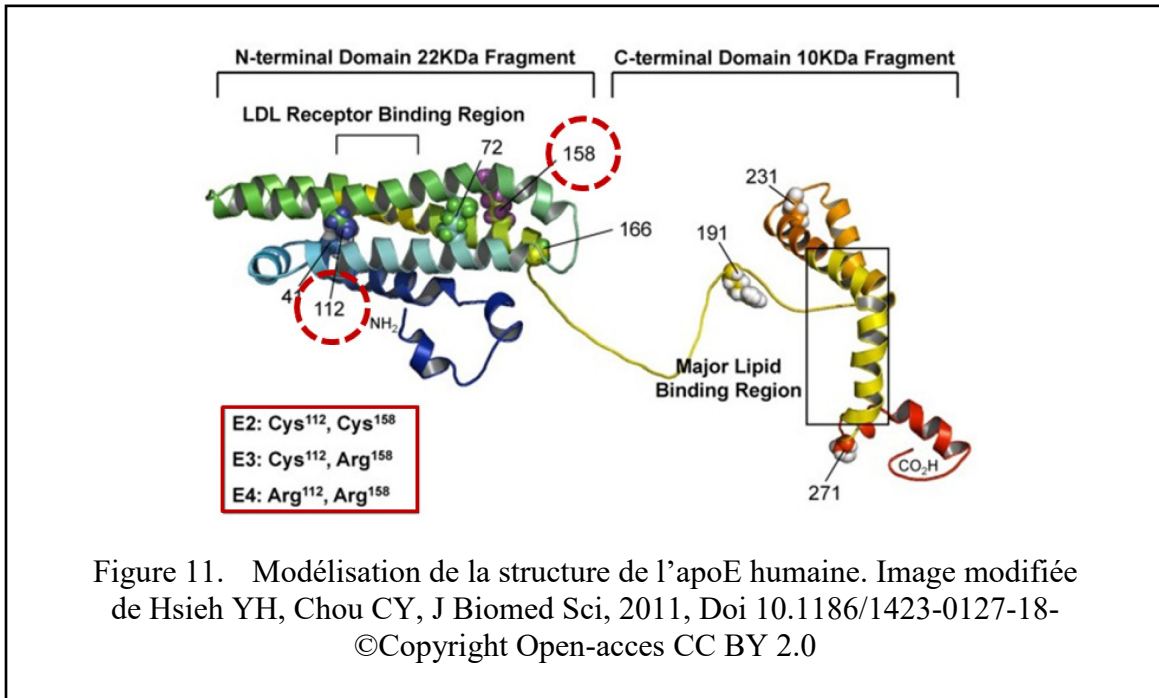
Il existe deux formes d'apolipoprotéines B, l'apoB-48 et l'apoB-100. L'apoB-48 et l'apoB-100 sont tous deux codés par le même gène. La méthylation d'une cytosine de l'ARN messager de l'apoB induit l'insertion d'un codon stop prématuré, la séquence protéique ainsi produite ne représente alors que 48% de la protéine totale (apoB-48) (176). Les apoB sont différentes des autres classes d'apolipoprotéines, chaque lipoprotéine ne contient qu'une seule apoB et celle-ci n'est pas transférable ou échangeable. L'apoB-100 est présente majoritairement dans les LDL, IDL et VLDL. Cette glycoprotéine est le ligand responsable de la liaison des LDL et des VLDL aux récepteurs des lipoprotéines (LDLR), l'apoB-100 est donc une composante essentielle du

transport du cholestérol vers les cellules cibles et du catabolisme des lipoprotéines (177). À l'opposé, l'apoB-48 possède un segment C-terminal tronqué et n'est donc pas en mesure de lier les LDLR (177). L'apoB-48 est produite par les entérocytes et aide à la formation des chylomicrons ainsi qu'à la solubilisation des triglycérides (178).

Les apoC sont les plus petites apolipoprotéines avec des poids moléculaires variant de 6 à 10 kDa. L'apoC-I est présente dans les HDL et les VLDL et peut être transférée dans la circulation des HDL vers les VLDL et inversement (179). Cette apolipoprotéine possède diverses activités enzymatiques : elle a la capacité d'inhiber la phospholipase A<sub>2</sub> à la surface des entérocytes, d'inhiber la lipase hépatique et de limiter la clairance des VLDL (180). Tout comme l'apoC-I, l'apoC-II est également contenue dans les VLDL et le HDL. Celle-ci est une composante importante du métabolisme des lipides puisqu'elle a la capacité de convertir les VLDL en LDL par l'activation de l'enzyme lipoprotéine lipase (181). Par ailleurs, une déficience en apoC-II chez les patients se traduit par une hypertriglycéridémie majeure (182). L'apoC-III pour sa part est connue pour inhiber l'action de la lipoprotéine lipase et bloquer la liaison des lipoprotéines riches en apoB aux LDLR. Les rôles d'apoC-III s'étendent au-delà du métabolisme des lipides : elle semble impliquée directement dans les maladies cardiovasculaires en régulant l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et la prolifération des muscles vasculaires lisses (183).

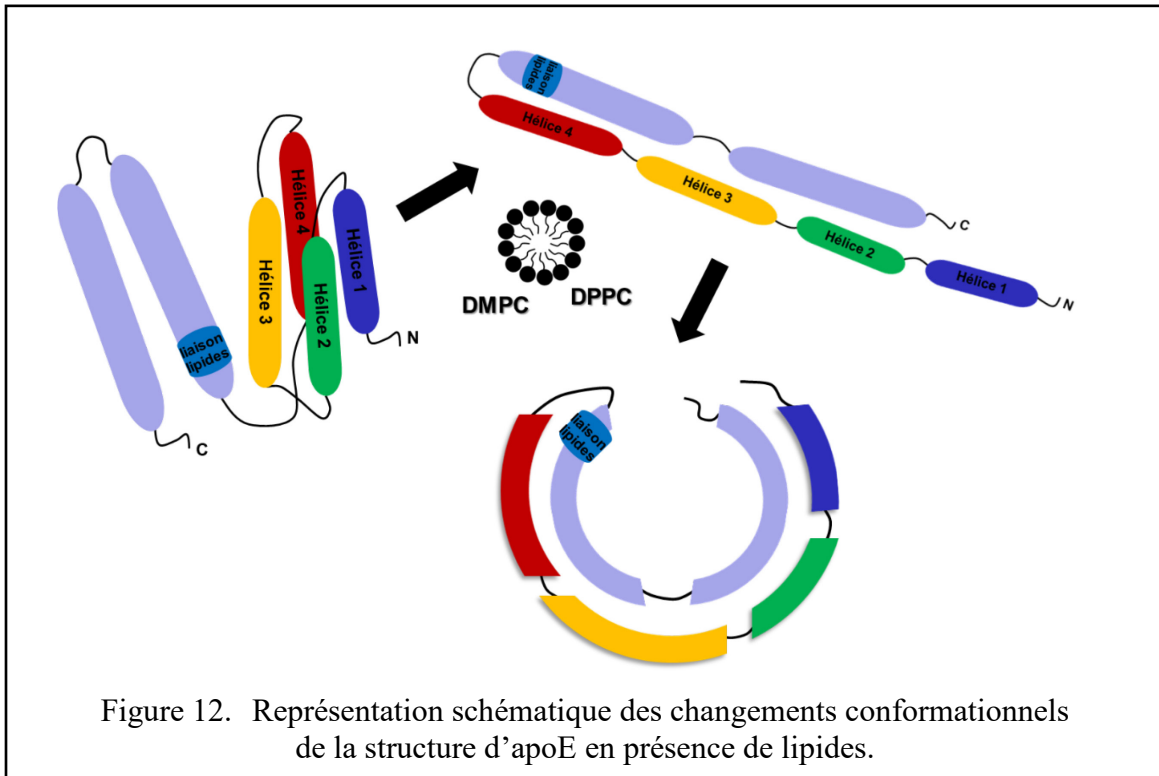
### **3.2.3. L'apolipoprotéine E**

L'apoE est une protéine amphipatique de 34,2 kDa comprenant une séquence mature de 299 a.a. (184). L'apoE est synthétisée dans le foie par les hépatocytes et dans le système nerveux par la microglie, les astrocytes et les neurones. Outre le foie et le cerveau, l'apoE peut être détectée chez l'humain dans les macrophages, la rate, les reins, les gonades et les glandes surrénales (185). En tant que ligand des récepteurs aux lipoprotéines, l'apoE est une glycoprotéine essentielle au métabolisme du cholestérol. Cette apolipoprotéine possède également des rôles dans la régulation du système immunitaire, dans plusieurs maladies neurodégénératives et ses effets sont étudiés dans des maladies rénales de même que dans certains cancers ovariens (185).



### 3.2.3.1. La structure de l'apoE

L'apoE4 est une glycoprotéine contenant deux domaines fonctionnels reliés par une région charnière. La section N-terminale est composée 191 a.a. sa structure tridimensionnelle est très semblable à celle des cytokines de types 1 avec 4 hélices alpha positionnées antiparallèlement deux à deux (186). Ce premier domaine structurel contient le site de liaison pour le récepteur aux LDL. Pour sa part, le domaine carboxy-terminal contenu entre les a.a. 225 et 299 arbore une seule hélice alpha présentant des propriétés hydrophobes qui permet la liaison aux lipides (186). En présence de lipides, l'apoE subit des changements structurels considérables (187). Des études de rayons X et de résonance magnétique démontrent qu'en présence de lipides tels que le DDPC ou le DMPC, l'apoE se déplie pour adopter une structure tridimensionnelle en fer à cheval (187, 188). Dans cette conformation la région responsable de la liaison aux LDLR se retrouve à l'extrémité de la structure. Il a donc été suggéré que ce réarrangement conformationnel favoriserait la liaison de l'apoE à son récepteur (187).



### 3.2.3.2. Les fonctions biologiques de l'apoE

Chez la souris, l'apoE est un élément important dans la formation des VLDL par les hépatocytes. La délétion d'apoE chez la souris diminue la sécrétion des VLDL, inversement la surexpression hépatique d'apoE provoque une augmentation de la production de ces lipoprotéines (189). L'apoE est aussi un régulateur de la lipolyse en modulant l'activité de la lipoprotéine lipase (190). En tant que ligand principal des LDLR, l'apoE est une des composantes les plus importantes de la clairance des triglycérides et du cholestérol (191). L'apoE est également un ligand des récepteurs des protéines reliées aux LDL, de la Sortiline, de SoLA et se lie à certains protéoglycanes (191-193).

L'apoE possède aussi des fonctions au niveau du système neuronal en régulant notamment la réparation tissulaire et la distribution du cholestérol dans le système nerveux central (185). L'apoE est l'apolipoprotéine la plus abondante dans le cerveau (194). En réponse au stress, par exemple un stress oxydatif, une blessure ou de l'ischémie, les neurones peuvent synthétiser de l'apoE (195). La redistribution des lipides par cette glycoprotéine favorise alors la réparation

tissulaire. Les rôles pathologiques de l'apoE4 dans la progression de l'Alzheimer sont détaillés dans la section suivante.

Il existe également de nombreuses évidences démontrant des rôles immunomodulateurs pour cette apolipoprotéine. L'apoE a entre autres été impliqué dans l'inflammation, l'hématopoïèse, la susceptibilité à la malaria et la réponse aux bactéries (196-198). Parmi les cellules immunes, les monocytes et les macrophages produisent de cette apolipoprotéine (199). L'apoE possède la capacité de moduler la polarisation des macrophages en diminuant l'expression d'iNOS, un marqueur des macrophages pro-inflammatoires classiques et en augmentant celle de l'arginase-1 (200). *In vitro*, les macrophages exprimant apoE4 ont été montrés comme produisant plus de TNF- $\alpha$  et moins d'IL-10 que les cellules exprimant apoE3 en réponse au LPS (200). L'apoE régule également l'infiltration des cellules immunes en inhibant l'expression de la molécule d'adhésion VCAM-1 sur les cellules endothéliales (201). Récemment il a été observé que cette glycoprotéine contrôle l'inflammation en augmentant l'expression du microARN miR-146A, un médiateur important de la régulation de NF- $\kappa$ B (164). De manière intéressante, l'étude des souris apoE<sup>-/-</sup> suggère aussi une implication de l'apoE dans la régulation de l'hématopoïèse; les souris apoE<sup>-/-</sup> possèdent 3 fois plus de cellules LSK que les souris sauvages et affichent une monocytose et une myélopoïèse importante (198).

### **3.2.3.3. Les isoformes d'apoE**

Il existe chez l'homme trois isoformes principales d'apoE nommées apoE2, apoE3 et apoE4. Elles se distinguent par le polymorphisme de 2 nucléotides aux positions 112 et 158 (186). L'isoforme la plus fréquente est l'apoE3 contenant une cystéine en position 112 ainsi qu'une arginine à la position 158. L'apoE2 contient une cystéine à la position 158 (Arg158Cys) alors que l'apoE4 possède une arginine à la position 112 (Cys112Arg) (186). Ces variations de la séquence primaire protéique affectent à la fois la structure et les fonctions biologiques d'apoE de sorte que ces différentes isoformes sont fortement associées à certaines conditions pathologiques. La fréquence allélique est distincte pour les trois isoformes : on retrouve entre 5 et 10% d'apoE2, 65-70% d'apoE3 et 15 à 20% d'apoE4 (186, 202).



Dans l'apoE2 la substitution d'une arginine par une cystéine à la position 158 a pour effet de déstabiliser un des ponts sodiques présents dans la région responsable de la liaison les LDLR (202). Ainsi, l'apoE2 possède une affinité diminuée pour le LDLR comparativement à l'apoE3 et l'apoE4. La diminution de l'affinité d'apoE pour son récepteur se traduit par une augmentation du taux circulant de lipoprotéines athérogènes, l'apoE2 est donc considérée comme un facteur de risque important dans les maladies cardiovasculaires coronariennes (202, 203).

Dans le cas de l'apoE4, l'ajout d'une arginine induit la création d'une interaction supplémentaire entre l'Arg-61 et la Glu-255 (186). Bien que la modification structurelle subséquente soit moins apparente que celle de l'apoE2, les conséquences de cette modification sont délétères dans de nombreuses pathologies. D'abord, le polymorphisme de l'apoE4, résulte en une structure plus compacte que celle d'apoE3 qui modifie la distribution de cette apolipoprotéine à travers les lipoprotéines. En effet, l'apoE4 s'associe préférentiellement aux VLDL contrairement à l'apoE2 et 3 qui s'associent aux HDL (202). La présence d'apoE4 sur les lipoprotéines riches en triglycérides induit une clairance rapide des VLDL menant à une diminution de l'expression de surface des LDLR. Cette diminution induit une augmentation des taux circulants de LDL. Pour cette raison, l'apoE4 est tout, comme l'apoE2, considéré comme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires(202).

L'apoE4 est aussi un facteur impliqué dans la neurobiologie de la maladie d'Alzheimer. Les patients homozygotes pour apoE4 arborent un risque de 40% plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer comparativement aux homozygotes apoE3. Les hétérozygotes apoE4/apoE3 ont également un risque plus élevé (20%) de développer cette pathologie (204). Dans cette neuropathologie l'apoE4 module la clairance d'amyloïde  $\beta$ , influence la survie cellulaire et active la mitochondrie (205). Par exemple, lors de dommages cellulaires les neurones peuvent synthétiser de l'apoE afin de favoriser la redistribution du cholestérol et la réparation tissulaire. L'apoE4 synthétisé par les neurones est plus sensible à la protéolyse que l'apoE3 (206). Les fragments résultant de la protéolyse d'apoE4 sont retenus dans les cellules et ne parviennent pas à être sécrétés. L'accumulation de ces fragments dans les neurones induit une dysfonction mitochondriale, affecte la phosphorylation de Tau (206). De plus, apoE4

favorise l'accumulation de plaques d'amyloïde  $\beta$ , les patients apoE4 ont un nombre de plaques séniles d'amyloïde  $\beta$  plus élevé que les patients non-apoE4. Les oligomères d'amyloïdes  $\beta$  s'associent à l'apoE pour former des complexes. Les complexes amyloïdes  $\beta$ /apoE4 sont moins stables que ceux formés avec les isoformes 2 et 3 (195). L'apoE4 a également été impliqué dans le métabolisme des peptides amyloïdes  $\beta$  en favorisant leur oligomérisation et en contribuant à leur stabilité. Les complexes apoE/amyloïdes  $\beta$  sont rapidement évacués du cerveau vers le sang à travers la BHE à l'aide des récepteurs LRP1. La structure compacte d'apoE4 inhibe la liaison des complexes amyloïdes  $\beta$ /apoE4 à LRP1, ces complexes sont éliminés du cerveau par une liaison aux VLDLR, mais avec une cinétique beaucoup plus lente que celle des complexes apoE3/LRP1 (205). Le ralentissement de l'élimination des peptides amyloïdes  $\beta$  favorise leur accumulation dans le système nerveux central et influence la création de plaques séniles.

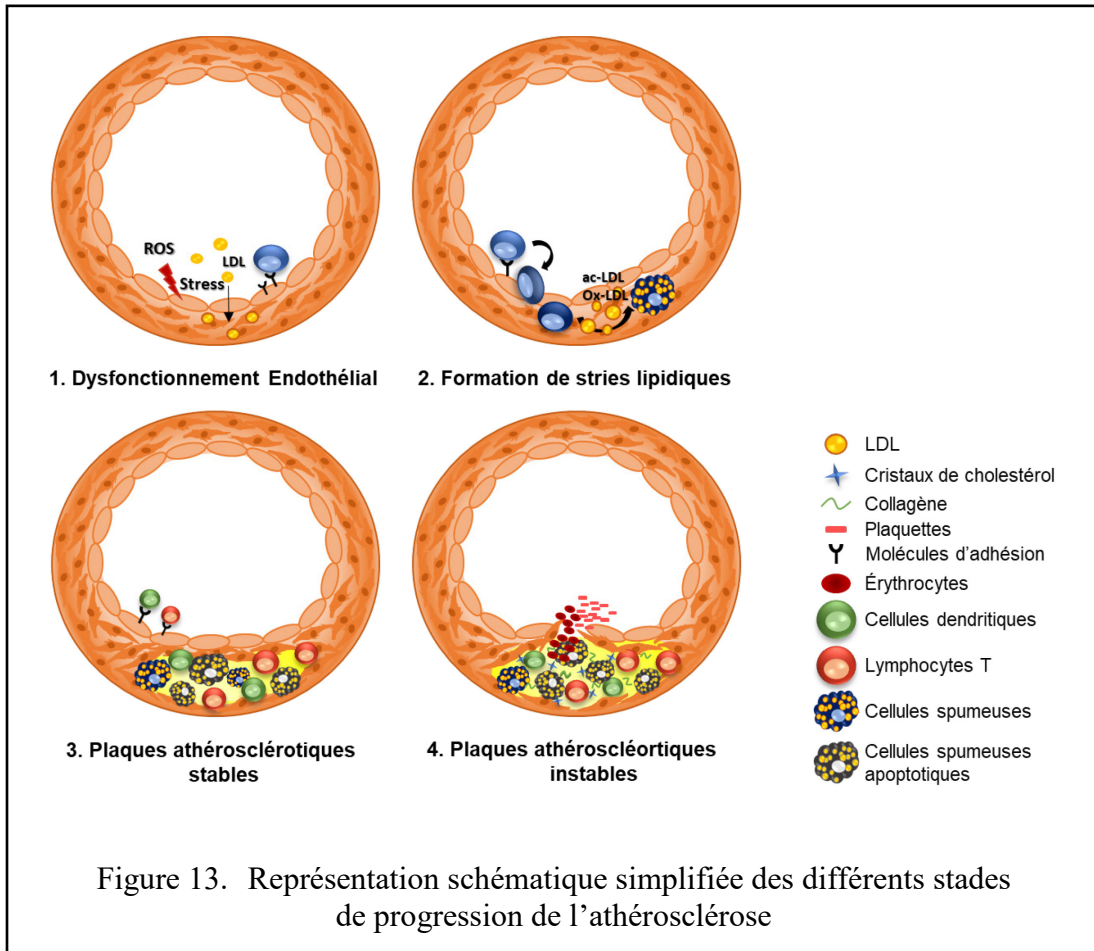
L'apoE4 a récemment été étudié comme facteur de risque pour la susceptibilité au VIH. *In vitro*, les cellules T sont plus facilement infectées par le virus du VIH en présence d'apoE4 comparativement à apoE3 (165). Cette particularité peut être expliquée par le fait que certaines apolipoprotéines ont la capacité de lier la protéine virale VIH gp141 et peuvent inhiber la fusion virale. Dans une revue de la littérature abordant les impacts fonctionnels des différentes structures d'apoE, Dr Mahley et ses collègues avancent l'hypothèse que les modifications structurelles entre les polymorphismes apoE3 et apoE4 pourraient influencer l'incorporation virale du VIH et moduler les risques d'infections (202). Toutefois, des études de cohortes n'ont pas été en mesure de démontrer une corrélation significative entre le risque d'infection au VIH et les polymorphismes d'apoE. Par contre, les travaux du Dr Burt ont pu montrer que l'absence d'allèles apoE3 était suffisante pour accélérer la vitesse de progression de cette immunodéficience (165). Les patients homozygotes pour apoE2 et apoE4 ont une progression de la maladie plus sévère et plus rapide que les patients apoE3. L'effet d'apoE4 sur la vitesse de progression de l'infection du VIH est corrélé avec une charge virale plus importante chez ces patients (165).

## **4. L'athérosclérose**

Les maladies cardiovasculaires et les complications qui y sont associées sont la principale cause de décès en Amérique du Nord (207). Parmi celles-ci, l'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire très répandue qui se manifeste par une perte d'élasticité des vaisseaux sanguins provoquant de l'insuffisance cardiaque, des anévrismes, des infarctus et serait responsable de près du tiers des décès en Amérique du Nord (207). L'athérosclérose est la résultante d'une accumulation de lipides et de cholestérol dans les parois artérielles induisant la formation de plaques d'athéromes. Une accumulation trop importante de ces plaques athérosclérotiques dans l'intima peut mener à la perturbation de la structure des artères, provoquer la rupture de celles-ci et induire la formation de thrombus (208). Bien que décrite à la fin des années 1500, l'étiologie et les différents mécanismes physiopathologiques de cette maladie sont encore mal compris. Parmi les facteurs de risques associés à l'athérosclérose, on retrouve certains facteurs génétiques, l'hyperlipidémie, l'hypercholestérolémie, la sédentarité et le tabagisme (209).

### **4.1. Le développement de l'athérosclérose**

L'athérosclérose peut être définie par une séquence d'évènements représentant les différents stades de progression de la maladie, soit : le dysfonctionnement endothélial et l'infiltration de lipoprotéines ; la formation de stries lipidiques, la formation de plaques athérosclérotiques stables ; l'émergence de plaques athérosclérotiques instables et finalement la rupture de plaques d'athérome (210).



#### 4.1.1. Le dysfonctionnement endothélial

Bien qu'encore débattu, le modèle le plus courant veut que l'initiation de l'athérosclérose soit expliquée par le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire des artères (210). L'endothélium consiste en une couche de cellules endothéliales tapissant la paroi interne des vaisseaux sanguins. Celui-ci régule la tonicité vasculaire et contrôle l'entrée et la sortie des molécules de la circulation sanguine vers la paroi artérielle et inversement (211). L'hypercholestérolémie, le stress oxydatif et les protéines pro-inflammatoires sont connus pour altérer la fonction endothéliale et peuvent augmenter la perméabilité vasculaire. Par exemple, dans le cas de l'athérosclérose, l'hypercholestérolémie et le déséquilibre du ratio de lipoprotéines de faible densité (LDL) par rapport aux lipoprotéines de haute densité (HDL) sont associés à des niveaux élevés en stress oxydatif et en espèces réactives d'oxygène (ROS) (212). Les ROS diminuent la biodisponibilité de l'oxyde nitrique (NO) une composante essentielle à l'homéostasie vasculaire (213-215). En effet, les ROS réagissent avec le NO ce qui provoque la

formation de peroxyde nitrique, une molécule réactive qui affecte sévèrement la viabilité des cellules endothéliales. Les lésions causées par la présence de peroxyde nitrique induisent une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, favorisant ainsi l'infiltration des LDL dans l'intima (214, 215). Outre, les lipides, les cytokines pro-inflammatoires, l'hypertension et l'âge sont également des facteurs qui modulent la biodisponibilité du NO et affectent la perméabilité endothéliale.

Lors de l'infiltration des LDL à travers l'endothélium artériel, les lipoprotéines subissent des modifications. Les travaux du Dr Steinbrecher et ses collègues ont en effet démontré que l'interaction des LDL avec les cellules endothéliales favorise l'oxydation des lipoprotéines par la sécrétion de radicaux libre et l'activation de phospholipases (216, 217). Les LDL modifiées sont retenues et s'accumulent dans la paroi artérielle grâce à l'interaction entre l'apolipoprotéine B des LDL et les protéoglycanes de la matrice (218).

#### **4.1.2. Les cellules spumeuses et la formation de stries lipidiques**

La présence de LDL modifiées dans l'intima induit l'expression de molécules d'adhésions à la surface de l'endothélium ce qui favorise le recrutement des monocytes circulants (219). La présence d'intégrines sur les monocytes circulants permet l'entrée de ces derniers dans la paroi artérielle via une interaction avec VCAM-1 ou ICAM-1 (220). Une fois dans l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages, ce qui initie le déclenchement d'une réaction inflammatoire (221). Les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui d'une part accentuent l'expression de molécules d'adhésion endothéliale favorisant le recrutement de plus de monocytes dans l'intima et d'autre part recrutent et activent d'autres types de cellules immunitaires (lymphocytes T, cellules dendritiques) créant une inflammation chronique dans les parois affectées (222). L'activité pro-inflammatoire des macrophages mène aussi à l'activation de métalloprotéinases affectant la matrice extracellulaire et les muscles vasculaires lisses (222).

Les macrophages sont des acteurs très importants dans la pathologie de l'athérosclérose. Ils sont responsables de l'installation de l'inflammation dans l'intima et également de la création de stries lipidiques par la formation de cellules spumeuses (222). Les cellules spumeuses sont

des macrophages engorgés de lipide et de cholestérol qui sont formés par l'internalisation d'une quantité importante de LDL modifiées. Comme détaillé dans le paragraphe précédent, les LDL présents dans la paroi peuvent être oxydés ou acétylés par différents mécanismes enzymatiques et non enzymatiques. Ces LDL modifiés sont alors internalisés par les macrophages à l'aide de différents récepteurs de type éboueurs (également appelés « scavengers »). Les principaux récepteurs décrits dans la littérature comme étant responsable de l'internalisation des LDL modifiées sont les récepteurs CD36 et SRA-1.

Le récepteur CD36 est une glycoprotéine membranaire appartenant à la classe B des récepteurs éboueurs. Il s'agit d'un récepteur multiligand exprimé à la surface des monocytes et macrophages, des mégacaryocytes, des plaquettes, des cellules musculaires lisses, et de plusieurs cellules du système cardiovasculaire (223). Il s'agit d'un récepteur de la thrombospondine 1 (TSP-1) pour les plaquettes, d'un transporteur d'acide gras pour les adipocytes ainsi que d'un ligand des lipoprotéines de faible densité. La liaison des lipoprotéines oxydées au CD36 entraîne l'activation de la voie d'endocytose et de NF- $\kappa$ b. L'absence de CD36 chez la souris *ApoE* KO a pour effet de diminuer de 80% les lésions athérosclérotiques suggérant ainsi que CD36 joue un rôle prépondérant dans la formation de cellules spumeuses et dans la progression de l'athérosclérose (224).

Pour sa part, le SRA-1 (CD204) est un récepteur éboueur de type A identifié à la fin des années 1970 qui possèdent des rôles athérogènes, métaboliques et immunitaires (225, 226). SRA-1 est un récepteur contenant 3 domaines transmembranaires et une très courte séquence cytoplasmique. Le domaine C-terminal est extracellulaire et contient une séquence riche en cystéine qui est responsable de la liaison aux lipoprotéines. Contrairement au récepteur CD36, le récepteur SRA favorise la phagocytose des LDL acétylés plutôt qu'oxydés (226). Outre son rôle proathérogène, ce récepteur éboueur possède des fonctions immunitaires, il favorise le remodelage osseux et son expression élevée dans la microglie est associée à la présence de plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer (226).

L'expression des récepteurs éboueurs est augmentée lors de la maturation des monocytes en macrophages (227). Les macrophages phagocytent donc de grandes quantités de lipoprotéines

oxydées et acétylées dans l'intima des artères. Les LDL sont ensuite transportées dans les endosomes puis les lysosomes. Le cholestérol est libéré des lipoprotéines dans les lysosomes. Le cholestérol libre est alors estérifié par des enzymes cytoplasmiques pour être entreposé et accumulé dans des gouttes lipidiques (227).

### **4.1.3. Les plaques d'athérome**

Dans le déroulement pathophysiologique de l'athérosclérose, les stries lipidiques évoluent vers les plaques athérosclérotiques. Les plaques d'athéromes se forment lorsqu'une partie des cellules spumeuses éclatent, libérant ainsi leur contenu en lipides et induisant la formation d'une zone nécrotique (228). Les corps nécrotiques sont composés de lipides, de cellules immunitaires et de cellules musculaires qui migrent de la media vers l'intima. Les corps nécrotiques et lipidiques sont recouverts d'une chape fibromusculaire composée d'un mélange de cellules musculaires lisses, de collagène et de protéoglycanes. La chape fibromusculaire se veut un mécanisme de remodelage du système vasculaire qui tente de maintenir la taille de la lumière artérielle (228). Le corps nécrotique et la chape fibreuse forment la plaque d'athérome mature, qui peut évoluer dans l'organisme pendant de nombreuses années (229).

### **4.1.4. Les plaques d'athérome instables**

L'intensité de l'inflammation locale et les modifications de la matrice extracellulaire peuvent provoquer l'instabilité de la plaque d'athérosclérose. Une plaque instable est responsable de la rupture du vaisseau et du développement de thrombus (229).

## **4.2. Les composantes de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle impliquant de nombreuses composantes telles que le métabolisme, le système immunitaire, le système cardiovasculaire et les muscles vasculaires lisses. Les rôles du métabolisme, par exemple le profil cholestérolémique, le ratio des lipoprotéines plasmatiques, et l'oxydation des LDL sont bien établis dans la littérature scientifique. L'implication du système immunitaire a pour sa part été décrite en premier lieu avec l'identification des cellules spumeuses. Toutefois, des études plus récentes indiquent que la composante immunitaire de cette maladie est beaucoup plus large et ne se limite pas à l'implication des macrophages. Les muscles vasculaires lisses qui constituent la structure de la

paroi des vaisseaux sanguins semblent également avoir de rôles actifs très importants dans la progression de cette pathologie et la stabilité des plaques d'athéromes (230). Ainsi, les prochaines sections de ce chapitre tenteront de décrire brièvement l'importance de ces différents systèmes dans le développement, la progression et les stratégies thérapeutiques de cette maladie cardiovasculaire.

#### **4.2.1. Le métabolisme des lipoprotéines**

Le métabolisme des lipides est particulièrement impliqué dans la pathogénicité de l'athérosclérose. L'hypertension et l'hypercholestérolémie sont des facteurs favorisant le stress oxydatif et les dommages de l'endothélium (210). Les lipoprotéines oxydées et acétylées sont les composantes principales des cellules spumeuses et sont donc responsables de la formation de stries lipidiques (210). La saturation des mécanismes cellulaires de prise en charge du cholestérol est aussi en cause dans le développement de l'athérosclérose résultant dans la formation de cristaux de cholestérol dans les macrophages, l'activation de l'inflammasome et l'apoptose des cellules(231). Pour cela, de nombreux efforts de recherches fondamentales et cliniques ont été effectués afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à réguler le métabolisme des lipides et du cholestérol afin de réguler et prévenir l'athérosclérose. Ces stratégies visent à diminuer les taux circulants de cholestérol en réduisant par exemple la formation des lipoprotéines ou la synthèse du cholestérol, en favorisant le transport inverse du cholestérol ou encore en augmentant la clairance des LDL (231). De l'élaboration de ces stratégies est ressortie des succès cliniques majeurs. Par exemple, l'utilisation des statines dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires a permis de diminuer de 25 à 40% (exemple 27% pour la pravastatine) le risque d'évènements reliés aux maladies artérielles (232). Brièvement, les statines sont des petites molécules inhibitrices de l'enzyme hydroxyméthylglutaryl (HMG) CoA réductase, une enzyme responsable de la synthèse du cholestérol hépatique. Les statines sont donc des molécules bloquant la synthèse de cholestérol, de VLDL et de LDL. Les statines ont aussi pour effet de diminuer l'expression des LDLR (233). Étant donné leurs succès cliniques flagrants, la prescription de statine est aujourd'hui considérée comme une première ligne de traitement à travers le monde pour l'athérosclérose.



Outre la synthèse du cholestérol, le transport inverse du cholestérol est aussi une voie métabolique fortement étudiée pour le traitement de l'athérosclérose. Les taux plasmatiques de HDL diminuent avec l'âge et semblent être inversement corrélés avec les risques de développer des maladies cardiovasculaires (234). Tel que mentionné dans le chapitre précédent, l'efflux de cholestérol et la formation des HDL dépendent de l'activité de transporteurs enzymatiques ABCA1, ABCG1, des enzymes LCAT et d'apoA-I. En clinique, l'utilisation d'acide nicotinique a des effets bénéfiques significatifs chez les patients en augmentant les niveaux circulants d'HDL (235). Un des mécanismes d'action anti-athérogènes de l'acide nicotinique est de diminuer la recapture hépatique d'apoA1(236).

Parmi les autres stratégies thérapeutiques étudiées favorisant le transport inverse du cholestérol, on retrouve l'inhibition de la CETP ainsi que des agonistes de PPAR $\gamma$ . La CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*) est responsable d'échanger les esters de cholestérol des HDL vers les lipoprotéines riches en triglycérides, pour favoriser la redistribution du cholestérol (162). Les inhibiteurs de la CETP ont connu beaucoup de déboires en phase clinique III, mais dernièrement un tel traitement a démontré un effet bénéfique, lorsque combiné avec les statines suggérant un potentiel clinique pour les inhibiteurs de la CETP (237). PPAR $\gamma$  est une autre cible du transport inverse du cholestérol puisqu'il favorise la transcription du transporteur ABCA1 (162). Certains de ses agonistes ont montré une efficacité dans la diminution de l'hypercholestérolémie, mais ont dû être arrêtés en raison d'effets indésirables trop importants (162). De nouveaux agonistes sont actuellement en essais cliniques (162).

Une autre cible dans le traitement de l'athérosclérose est la proprotéine convertase PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). Cette enzyme est responsable de la dégradation des LDLR au niveau hépatique. Le rôle de PCSK9 est donc néfaste dans l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose puisqu'elle diminue la clairance des lipoprotéines riche en triglycérides en diminuant la disponibilité des LDLR (238, 239). Des inhibiteurs de PCSK9 ont rapidement été développés suite à l'identification des fonctions biologiques de cette enzyme (239). Des essais cliniques ont d'ailleurs démontré une réduction de 60% des taux de LDL circulants dans les patients traités avec ces inhibiteurs. Pour ces raisons, des inhibiteurs de PCSK9 ont été approuvés en clinique en 2015 pour le traitement de l'hypercholestérolémie familiale et

l'athérosclérose (240). Les succès marqués des inhibiteurs de PCSK9 confortent fortement l'hypothèse selon laquelle les taux de LDL sont directement reliés aux risques de maladies cardiovasculaires (240).

Dans le chapitre précédent, les polymorphismes d'apoE ont été décrits comme d'importants facteurs de risque des maladies cardiovasculaires en raison de leur impact sur le métabolisme du cholestérol. Aujourd'hui, plusieurs laboratoires de recherche travaillent au développement de petites protéines pour modifier la structure d'apoE4 vers une conformation structurale semblable à celle d'apoE3. Sans surprise, ces efforts ont été effectués dans le but d'identifier des traitements potentiels pour freiner la progression de la maladie d'Alzheimer. Toutefois, la structure compacte d'apoE4 est également responsable de la distribution anormale d'apoE4 dans les VLDL. Ainsi, les peptides corrigeant la structure d'apoE4 pourraient s'avérer bénéfiques dans le traitement de l'athérosclérose (241). Jusqu'à présent, l'efficacité d'une de ces molécules a été établie sur des cultures de neurones murins ou provenant d'IPSC de patients *in vitro* (242, 243). Aucune donnée n'est disponible à ce jour concernant l'efficacité de ce correcteur de structure dans l'athérosclérose en essais cliniques.

#### **4.2.2. Le système immunitaire**

L'inflammation est une composante très importante dans la physiopathologie de l'athérosclérose (244). Les patients comportant des maladies artérielles présentent un pourcentage plus élevé de monocytes pro-inflammatoires CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>, comparable aux monocytes Ly6C<sup>+</sup> dits classiques chez la souris (245, 246). Un taux plus élevé de TNF- $\alpha$  en circulation a également été observé chez ces patients (247). Outre l'infiltration élevée de monocytes pro-inflammatoires dans l'intima, la transformation des monocytes en macrophages s'avère également une étape essentielle à la formation de plaques athérosclérotiques. Cette différenciation est entre autres induite suite à la sécrétion de M-CSF par les cellules endothéliales et les muscles vasculaires lisses (248). Pour cette raison, les souris déficientes en M-CSF présentent une résistance marquée à l'athérosclérose (249). Dans la plaque athérosclérotique, les macrophages et les cellules spumeuses activées contribuent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que : l'IL-1, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, le TNF et l'IFN- $\gamma$  (244). Ces médiateurs solubles possèdent des rôles délétères prépondérants,

illustrés notamment par le succès clinique du Canakinumab un anticorps humanisé dirigé contre IL-1 $\beta$  (250). La sécrétion de ces cytokines induit le recrutement de nombreuses cellules immunitaires dans la paroi artérielle et contribue à l'installation et la progression de l'inflammation chronique.

En présence de GM-CSF, les monocytes infiltrant se différencient en cellules dendritiques (DC) plutôt qu'en macrophages. Les DC dérivées des monocytes jouent un rôle important dans la progression des plaques d'athéromes. Les DC expriment à leur surface les récepteurs éboueurs qui permettent la phagocytose des LDL oxydées. L'internalisation des LDL modifiées permet alors l'activation de ces cellules et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (244). En tant que cellules présentatrice d'antigène (APC), les DC activées migrent ensuite vers les organes lymphoïdes pour induire l'activation et la prolifération clonale des lymphocytes T spécifiques aux LDL oxydées (244, 251).

Les lymphocytes T spécifiques aux LDL modifiées sont recrutés aux lésions athérosclérotiques et majoritairement polarisés vers un profil Th1 en raison de l'environnement qui y règne (252, 253). Les cellules Th1 produisent des quantités importantes de cytokine et d'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  affecte l'homéostasie des cellules vasculaires lisses et déstabilise la chape fibreuse des plaques d'athéromes. L'injection d'IFN- $\gamma$  recombinant chez la souris mène à une augmentation significative de la taille des plaques (254, 255). Le rôle des cellules Th2 dans la progression de la maladie est encore aujourd'hui incompris. Contrairement aux cellules Th1, les cellules Th2 sont plutôt rares dans les lésions athérosclérotiques et semblent jouer un rôle plus tardif dans l'installation de l'inflammation chronique (244, 256). Les cellules T CD8 pour leur part semblent combiner les rôles protecteurs et délétères dans l'athérosclérose (257). Les cellules T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ont été montrées pour avoir des effets bénéfiques dans la réduction des plaques d'athérome en raison de leurs activités suppressives similaires aux lymphocytes Treg. En effet, dans les lésions athéromateuses, ces cellules sont en mesure de produire de l'IL-10 et du TGF $\beta$  (258). Toutefois, les lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont également des cellules favorisant la myélopoïèse et leurs actions cytotoxiques ont pour effet d'augmenter l'inflammation des parois artérielles (257).

Les lymphocytes B sont également présents dans les lésions athérosclérotiques, mais dans une moindre mesure que les lymphocytes T (244). Leur rôle dans la progression de cette pathologie a été largement étudié à l'aide de modèles murins depuis le début des années 2000 (259). Par exemple, les travaux du Dr Doran ont démontré un rôle protecteur des lymphocytes B chez la souris en comparant les lésions athérosclérotiques dans des souris  $\mu$ MT/apoE<sup>-/-</sup> et apoE<sup>-/-</sup> (260). La reconstitution à l'aide de cellules B fonctionnelles chez la souris  $\mu$ MT/apoE<sup>-/-</sup> a pour effet de retarder significativement la progression des lésions athérosclérotiques. Similairement, le transfert adoptif de lymphocytes B spléniques dans des souris apoE<sup>-/-</sup> a pour effet d'atténuer la progression de l'athérosclérose (259). À l'opposé, l'utilisation d'anti-CD20 chez la souris athérosclérotique sur diète riche en gras induit une atténuation des lésions d'athéromes, démontrant un rôle proathérogénique des lymphocytes B plutôt qu'athéroprotecteur dans ce modèle (261). Les rôles proathérosclérotiques des lymphocytes B ont également été observés chez les souris *BaffR*<sup>-/-</sup> apoE<sup>-/-</sup> (souris déficientes en cellules B2-B) (262). Des études supplémentaires ont démontré que le sous-type B1 de cellules B, responsable de la production d'IgM serait protecteur dans la pathologie alors que le sous-type B2 fortement présente dans la zone marginale de la rate aurait des rôles délétères ce qui pourrait expliquer la dichotomie des résultats sur les rôles des lymphocytes B dans l'athérosclérose décrits dans la littérature (244, 263). La provenance, l'âge et la quantité des cellules B semblent aussi influencer le profil athérogénique ou athéroprotecteur des lymphocytes B chez la souris. Chez l'humain, des cellules B circulantes produisant des IgM spécifiques pour les LDL modifiés ont été identifiées (264, 265). Les niveaux sériques d'IgM contre les LDL modifiées semblent diminuer en fonction de l'âge. La corrélation inverse entre les niveaux d'IgM anti-oxLDL et les risques d'athérosclérose suggère que ces anticorps ont des rôles athéroprotecteurs (266).

Les fonctions détaillées ci-dessus des monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et lymphocytes B montrent clairement l'implication du système immunitaire inné et adaptatif à tous les stades de progression de l'athérosclérose. Les cytokines de la famille de l'IL-6 possèdent des rôles prépondérants dans la régulation de l'immunité cellulaire et humorale et sont donc considérées comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Les rôles de l'IL-6 dans l'athérosclérose sont controversés dans la littérature, arborant à la fois des rôles pro et anti-athérogènes selon les publications. Les effets

proathérogènes de l'IL-6 incluent entre autres ses rôles prothrombotiques, ses effets prolifératifs envers les cellules vasculaires lisses et l'induction d'une élévation de l'expression des molécules d'adhésion ICAM et VCAM sur les cellules endothéliales des parois artérielles (267-269). L'injection de sgp130Fc dans un modèle murin d'athérosclérose, résultant en un blocage de la signalisation en trans de l'IL-6, diminue la taille et le nombre des plaques d'athéromes (270).

Des études effectuées chez le lapin suggèrent des rôles protecteurs pour le LIF dans le développement et la progression de l'athérosclérose. En effet, l'infusion de la cytokine pendant 4 semaines chez des lapins soumis à une diète riche en cholestérol a mené à une diminution des taux plasmatiques de cholestérol et un nombre considérablement plus faible de lésions athérosclérotiques, suggérant ainsi que le LIF possède la capacité de ralentir le développement de cette pathologie (271). Des recherches subséquentes ont ensuite démontré que le LIF était également en mesure de limiter la progression de la maladie lorsque celle-ci est déjà établie (272). L'effet du LIF sur le métabolisme du cholestérol semble contribuer à ses rôles bénéfiques dans cette pathologie : le LIF induit l'augmentation de l'expression des LDLR à la surface des hépatocytes diminuant ainsi la quantité de LDL et de cholestérol en circulation (273). Le LIF a également des fonctions dans la régulation de la réactivité vasculaire et la synthèse d'iNOS qui contribuent aux rôles athéroprotecteurs de la cytokine (274). Chez l'homme, l'angiogenèse est considérée comme néfaste dans la progression de l'athérosclérose en altérant la stabilité de la plaque d'athérome. Les effets anti-angiogéniques du LIF pourraient donc également contribuer à retarder la progression de cette pathologie.

Comme l'IL-6, le LIF et la CT-1, l'Oncostatine M (OSM) a été détectée dans les lésions lipidiques des patients athérosclérotiques (275-278). La présence d'OSM dans l'intima a été observée chez des souris apoE<sup>-/-</sup> de 20 semaines alors que la cytokine a pu être détectée plus fortement dans la média et l'intima de ces souris à 30 et 54 semaines (278). L'OSM, sécrétée par les monocytes infiltrants et les macrophages de la plaque, agit de manière pléiotropique sur les différents types cellulaires de la paroi artérielle. L'OSM induit une rapide augmentation de l'expression des molécules d'adhésions P-sélectine, E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales favorisant la transmigration des monocytes et des lymphocytes T (279). Cette cytokine favorise également la sécrétion d'IL-6, COX-2, VEGF et de MMPs par les

cellules vasculaires lisses (280). L'OSM, de même que l'IL-6 et la CT-1, possède des rôles vasoconstricteurs néfastes en modulant la synthèse de eNOS, en induisant la production d'endothéline-1 un puissant peptide vasoconstricteur et favorisant la production d'angiotensine-2 (281).

Les rôles de CT-1 dans l'athérosclérose sont multiples et ont récemment été résumés dans un article de revue écrit par le Dr Watanabe et son équipe (276). Les fonctions proathérogènes de la CT-1 sont nombreuses chez la souris comme chez l'homme. Par exemple, l'administration répétée et prolongée (4 semaines) de la cytokine recombinante chez la souris apoE<sup>-/-</sup> résulte en une accélération importante de la progression de la pathologie et est corrélée avec une augmentation du nombre de monocytes infiltrant et de macrophages dans les lésions athéromateuses (276). Inversement, l'administration d'anti-CT1 a pour effet de prévenir le développement des plaques et de réduire l'infiltration des cellules myéloïdes dans les parois artérielles (276). La CT-1 régule également la prolifération et la migration des cellules vasculaires lisses de la media vers l'intima et favorise la synthèse de collagène-1, ce qui a pour effet d'induire l'instabilité des plaques d'athéromes (276). Chez l'humain, la CT-1 stimule la différenciation des macrophages en cellules spumeuses en augmentant l'expression de surface du récepteur CD36 (276). Cette cytokine a également été démontrée pour promouvoir l'inflammation en induisant la sécrétion d'IL-6, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et la production de superoxyde par les monocytes humains (282). Des taux plasmatiques élevés de CT-1 sont fortement associés chez l'homme à des conditions cardiaques néfastes telles que l'hypertension, les syndromes coronariens et la rigidité artérielle (283). Pour cette raison, cette cytokine de la famille de l'IL-6 est considérée comme un biomarqueur important des maladies cardiovasculaires.

Les activités biologiques de CLCF1 dans un contexte d'athérosclérose demeurent à ce jour inexplorées. Les résultats présentés dans la deuxième section de cette thèse démontrent des effets de la cytokine dans la myélopoïèse et dans la formation de cellules spumeuses. Ces résultats suggèrent des fonctions proathérogènes pour CLCF1 et ouvrent la voie à des études précliniques sur son potentiel comme cible thérapeutique.

## II. Hypothèses et objectifs de recherche

L'ARNm de CLCF1 a été détecté dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Contrairement à son homologue le CNTF, CLCF1 est efficacement sécrété des cellules via la formation d'une cytokine composite avec le récepteur soluble aux cytokines CRLF1. À la différence de l'IL-6, du LIF et de plusieurs autres cytokines de la même famille, les connaissances sur les activités biologiques de CLCF1 sont limitées. Cette cytokine a d'abord été identifiée pour ces capacités neurotrophiques notamment dans le développement et la survie des neurones moteurs de même que pour son rôle dans la prolifération des lymphocytes B.

L'étude des syndromes associés à des mutations dans les gènes codants pour CLCF1 ou son partenaire de sécrétion CRLF1 suggère des fonctions non redondantes dans la régulation du système immunitaire. Les patients Crisponi souffrent d'infections récurrentes durant l'enfance et la majorité de ces patients décèdent lors d'épisodes de fortes fièvres. Les souris hétérozygotes pour CLCF1 présentent des concentrations sanguines de leucocytes réduites.

À la lumière de ces observations, nous avons énoncé l'hypothèse que CLCF1 possède des fonctions biologiques dans le développement et la régulation du système immunitaire. L'objectif initial de cette thèse était de caractériser les rôles de CLCF1 dans l'hématopoïèse.

Les résultats découlant de cette étude nous ont amenés à postuler une fonction de CLCF1 dans la régulation de la différenciation des cellules myéloïdes. La deuxième étude a eu comme objectif d'évaluer la capacité de CLCF1 à moduler la signalisation et la polarisation des macrophages.

Parallèlement à ces deux études, nous avons émis l'hypothèse que CLCF1 pouvait interagir avec le domaine N-terminal de l'apolipoprotéine E sur la base de plusieurs indices. Le segment N-terminal de l'apoE possède une forte homologie de structure avec les cytokines de type I. Le

CNTF forme un complexe avec l'apoE3. De plus, CLCF1 et apoE partagent plusieurs caractéristiques communes intrigantes. Par exemple, ces protéines ont toutes deux tendances à former des dimères en circulation et partagent comme récepteur commun la Sortiline et SorLA. Ainsi, le troisième objectif de ma thèse fut d'étudier l'interaction entre les différentes isoformes d'apoE et CLCF1 et d'évaluer si l'apoE pouvait influencer les activités biologiques de la cytokine.



### **III. Résultats**



## **Article 1.**

Pasquin S., Tormo, A., Moreau, J., Laplante, V., Sharma, M., Gauchat, JF., Rafei, M. (2018).  
CardiotrophinLike Cytokine Factor 1 Exhibits a Myeloid-Biased Hematopoietic-Stimulating  
Function.

Article original soumis à *Frontiers in Immunology*.

En révision

# **Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 Exhibits a Myeloid-Biased Hematopoietic-Stimulating Function**

Running title: CLCF1: a potent inducer of myelopoiesis

Sarah Pasquin,<sup>1</sup> Aurélie Tormo,<sup>1,2</sup> Jessica Moreau,<sup>1</sup> Véronique Laplante,<sup>1</sup> Mukut Sharma,<sup>3</sup> Jean-François Gauchat<sup>1\*</sup> and Moutih Rafei<sup>1,4,5\*</sup>

## Affiliations

1Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

2ImmuniT, Montreal, QC, Canada.

3Renal Division, KCVA Medical Center, Kansas City, MO, USA.

4Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

5Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montreal, QC, Canada.

\*To whom correspondence should be addressed:

Dr. Moutih Rafei: [moutih.rafei.1@umontreal.ca](mailto:moutih.rafei.1@umontreal.ca);

Dr. Jean-François Gauchat: [jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca).

Keywords: Cardiotrophin-like cytokine factor 1, Interleukin-6, LSK, myelopoiesis, bone marrow transplantation.

## ABSTRACT

Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) is secreted as a complex with the cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1). Syndromes caused by mutations in the genes encoding CLCF1 or CRLF1 suggest an important role for CLCF1 in the development and regulation of the immune system. In mice, CLCF1 induces B-cell expansion, enhances humoral responses and triggers autoimmunity. Interestingly, inactivation of CRLF1, which impedes CLCF1 secretion, leads to a marked reduction in the number of bone marrow (BM) progenitor cells, while mice heterozygous for CLCF1 display a significant decrease in their circulating leukocytes. We therefore hypothesized that CLCF1 might be implicated in the regulation of hematopoiesis. To test this hypothesis, murine hematopoietic progenitor cells (HSCs) defined as Lin-Sca1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> (LSK) were treated *in vitro* with ascending doses of CLCF1. The frequency and counts of LSK cells were significantly increased in the presence of CLCF1, which may be mediated by several CLCF1-induced soluble factors including IL-6, G-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-10 and VEGF. CLCF1 administration to non-diseased C57BL/6 mice resulted in a pronounced increase in circulating myeloid cells, which was concomitant with augmented LSK and myeloid cell counts in the BM. Likewise, CLCF1 administration to mice following sub-lethal irradiation or congenic BM transplantation (BMT) resulted in accelerated LSK recovery along with a sustained increase in BM-derived CD11b<sup>+</sup> cells. Altogether, our observations establish an important and unforeseen role for CLCF1 in regulating hematopoiesis with a bias towards myeloid cell differentiation.

## INTRODUCTION

Hematopoiesis is a tightly regulated process involving numerous factors controlling the balance between HSC self-renewal and lineage commitment (Metcalf, 1993). Besides the role played by HSC-specific transcription factors, cytokines of the IL-6 family have been shown to exert important functions in the regulation of HSC biology. This is exemplified by the fact that IL-6, which is produced by BM-resident mesenchymal stem cells, acts synergistically with IL-3 to induce HSC and progenitor cell proliferation (Kishimoto, 1989; Hirano et al., 1990). Consistent with this notion, IL-6 disruption in mice decreases the levels of committed progenitors and colony forming units (Bernad et al., 1994), while inactivating IL6ST, the gene coding for the common IL-6 family receptor chain gp130 is embryonically lethal due to constrained hematopoietic development (Yoshida et al., 1996). In addition to IL-6, a role for leukemia inhibitor factor (LIF; another member of the IL-6 cytokine family) has also been proposed for stem cell survival and proliferation as its administration to mice increases the counts of megakaryocyte progenitor cells both in the BM and spleen (Metcalf et al., 1990; Pruijt et al., 1997).

CLCF1 is another member of the IL-6-type cytokine and is expressed in lymph nodes, spleen and by circulating lymphocytes (Senaldi et al., 1999; Senaldi et al., 2002; Murakami et al., 2004). In order to be efficiently secreted, CLCF1 needs to form a composite cytokine with CRLF1 (Elson et al., 2000). CLCF1 is believed to signal through the heterodimerisation of the signaling chains LIFR $\beta$  and gp130, which suggests similar overlapping functions with LIF (Elson et al., 2000). So far, CLCF1 is considered as a neurotrophic factor because of its implication in the survival and development of motor neurons (Zou et al., 2009). Alike other members of the IL-6 cytokine family however, CLCF1 exerts immunomodulatory functions such as supporting B-cell expansion and humoral responses (Senaldi et al., 2002). Of note, CLCF1 overexpression in mice leads to splenomegaly, whereas mice heterozygous for CLCF1 display lower circulating leukocyte counts (Senaldi et al., 2002). Among other severe phenotypes, mice lacking CRLF1 display a strong decrease in hematopoietic progenitor cell numbers (Alexander et al., 1999). These observations led us to examine whether CLCF1 exerts an effect on hematopoiesis. We report in this study a potent and unforeseen role for CLCF1 on

HSC proliferation *in vitro* with a myeloid-biased hematopoiesis in both healthy animals and following immunoablation.

## **Materials and Methods**

### **Experimental animals**

Female C57BL/6 (H2-Kb) and B6.SJL (H2-Kb) mice (6-8 weeks of age) were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed at the animal facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer (Montreal, QC). All experimental procedures were conform to the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Animal Ethics Committee of Université de Montréal.

### **LSK expansion protocol**

Production, purification and quantification of recombinant murine CLCF1 were conducted as previously described (Pasquin et al., 2018). BM cells were isolated by flushing femurs and tibias of 8-week-old C57BL/6 female mice followed by red blood cell lysis using an ammonium-based buffer. BM-derived white blood cells were then resuspended at  $5 \times 10^5$  cells/ml in RPMI media supplemented with 10% FBS, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.1 mM β-mercaptoethanol. Cells were stimulated with recombinant murine CLCF1 or murine IL-6 (at the indicated concentrations) and incubated at 37°C for 24, 48 or 72 h. Stimulated cells were then harvested and stained in PBS containing 0.1% BSA using V450-conjugated anti-Lineage Cocktail, PercPCy5.5-conjugated anti-CD117 (c-Kit) and APC-Cy7-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca1) (all purchased from BD Bioscience, Mississauga, ON). Fluorescence was quantified with a FACS Canto II flow-cytometer (BD Bioscience).

### **Induction and analysis of LSK proliferation *in vitro***

BM cells were cultured for 24 h as described above in presence of PBS, 10 ng/ml or 100 ng/ml of CLCF1. Cells were further incubated with 10 µM of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 18 h following manufacturer instructions (Click-it EdU Alexa Fluor488 flow cytometry assay kit,

ThermoFisher Scientific Inc, Burlington, ON). Cells were washed then stained with V450-conjugated anti-Lineage Cocktail, PercPCy5.5-conjugated anti-CD117 and APC-Cy7-conjugated anti-Ly-6A/E (all purchased from BD Bioscience) prior to fixation and permeabilization. Prepared cells were then incubated with Click-it reaction cocktail for 30 min and the fluorescence quantified by flow-cytometry.

### **STAT3 tyrosine phosphorylation assays**

Freshly isolated BM cells were stained with anti-Lineage Cocktail, anti-CD117 and anti-Ly-6A/E and resuspended at  $1 \times 10^8$  cells/ml in sorting buffer (PBS supplemented with 1mM EDTA, 25 mM Hepes and 1% FBS). LSKs were sorted using BD FACS Aria high-speed cell sorter (BD Bioscience). Both WBM cells and sorted LSKs were stimulated for 15 min at 37 °C with 100 ng/ml of IL-6 or CLCF1. Cells were fixed with 2% formaldehyde for 10 min at room temperature and permeabilized on ice with 90% methanol for 30 min prior to staining with Alexa Fluor-488-conjugated anti-pSTAT3 (BD Bioscience). Assessment was realised by flow-cytometry.

### **Conditioned media (CM)-based LSK expansion**

BM-derived white blood cells were resuspended at  $5 \times 10^5$  cells/ml in RPMI media complemented with 10% FBS, 10 mM Hepes, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.1 mM β-mercaptoethanol. Cells were stimulated with PBS or CLCF1 for 4 h, washed, then cultured in fresh RPMI media for 24 h. The following day, CM was collected prior to the assessment of LSK frequency by flow-cytometry. CM was further incubated with freshly isolated BM cells for 24 h and LSK frequency was assessed by flow cytometry as described above.



## **Cytokine and chemokine quantification**

BM-derived cells were stimulated with recombinant murine CLCF1 (0, 10, 50, 100, 1000 ng/ml) and incubated at 37°C for 24 h. Cell supernatants were collected and analyzed using the 31-plex mouse cytokines/chemokines arrays (Eve Technologies Corporation, Calgary, AB).

## **Analysis of hematopoiesis in mice undergoing CLCF1 administration**

Three sets of *in vivo* experiments were conducted. In the first setting, female 6-8 weeks old C57BL/6 mice (n=5/group) received 5 daily intra-peritoneal (i.p.) injections of PBS or CLCF1 (50 or 300 µg/kg). Splenocytes, blood and BM cells were harvested from mice sacrificed at day 8 and quantified by flow-cytometry. BM cells were stained for 1 h on ice with PBS containing 0.1% BSA, V450-conjugated anti-Lineage Cocktail, PercPCy5.5-conjugated anti-CD117 (c-Kit) and APC-Cy7-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca1) (all purchased from BD Bioscience). Splenocytes, blood cells and BM cells were stained in PBS containing 0.1% BSA, APC-eFluor7-conjugated anti-CD11b, FITC-conjugated anti CD19 and eFluor 450-conjugated anti-CD3 (all purchased from ThermoFisher Scientific Inc).

In the study concerning the effect of CLCF1 on mice undergoing sub-lethal irradiation, female 6-8 weeks old C57BL/6 mice (n=10 per group) were subjected to 5 Gy irradiation 24 h prior to treatments. PBS or CLCF1 (100 µg/kg) were administered i.p. daily for 5 consecutive days. Five mice per group were sacrificed at day 8 or day 28 after irradiation and BM-derived LSKs were quantified by flow-cytometry as described above. BM cells were stained with PE-conjugated anti-CD11b and APC-conjugated anti-CD19 (BD Bioscience). Fluorescence was quantified using a FACS Canto II flow cytometer.

In the third and final setting, irradiated female C57BL/6 recipient mice (n=10/group) were transplanted with  $2 \times 10^6$  T-cell-depleted B6.SJL-derived BM (CD45.1<sup>+</sup> → CD45.2<sup>+</sup>). On the following day, mice were i.p.-injected with CLCF1 (300 µg/kg), IL-7 (50 µg/kg), or equivalent volume of PBS every 2 days over a total period of 2 weeks (7 injections altogether). Immune

reconstitution was assessed weekly starting a week 2 using both the Scil vet ABC Plus+ hematological analyzer (Scil animal care company GmbH, Gurnee, IL) and flow-cytometry on collected blood samples. Mice were sacrificed at weeks 4 and 9 for analysis of their BM and spleen compartments. Splenocytes and blood cells and BM cells were stained with PBS containing 0.1% BSA, APC-conjugated anti-CD45.2, PE-conjugated anti-CD45.1, APC-eFluor780-conjugated anti-CD11b, FITC-conjugated anti-CD19 and eFluor 450-conjugated anti-CD3 (all purchased from ThermoFisher Scientific Inc). HSC cells were quantified using PE conjugated anti-CD45.1, V450 conjugated anti-Lineage Cocktail, PercPCy5.5-conjugated anti-CD117 (c-Kit) and APC-Cy7-conjugated anti-Ly-6A/E (Sca1), APC-conjugated anti-CD150 and PEcyanine7-conjugated anti-CD48 (BD Bioscience).

### **Statistical Analysis**

P-values were calculated using one-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc test where appropriate. Results are represented as average mean with S.D. error bars and statistical significance is represented with asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **RESULTS**

### **CLCF1 supports the expansion of LSK cells *in vitro***

We first evaluated the capacity of CLCF1 in triggering HSC and early progenitor expansion *in vitro*. The whole BM (WBM) collected from C57BL/6 mice was incubated with increasing concentrations of CLCF1 for 24, 48 or 72 h. Addition of 50-1000 ng/ml of CLCF1 for 24 h increased both LSK frequency and absolute counts (Fig 1A-B), which was further confirmed by EdU incorporation (Figure 1C). The observed increase in HSC and early progenitors was maintained up to 72 h indicating a long-lasting effect of CLCF1 in limiting cell differentiation and/or maintaining self-renewal (Figure 1D-E). Altogether, these results reveal a yet undiscovered capacity for CLCF1 in promoting LSK expansion *in vitro* as a stand-alone treatment.

### **CLCF1-induced LSK expansion involves soluble mediators**

The effects of CLCF1 on neurons, skeletal muscle cells and podocytes are believed to be exhibited by the recruitment of the heterotrimeric CNTF receptor comprising CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  and gp130 (Elson et al., 2000). The net outcome culminates in JAK/STAT-mediated activation of STAT1 and STAT3. However, CNTFR $\alpha$  is absent on immune cells suggesting an alternative CLCF1 mechanism of action at play (MacLennan et al., 1994; Ip et al., 1995; Beltran et al., 2003; Fuhrmann et al., 2003). To unveil CLCF1 mode of action on LSK cells, we compared STAT3 phosphorylation in both WBM and sorted LSK cells in response to *in vitro* CLCF1 stimulation. Interestingly, both CLCF1 and IL-6 triggered STAT3 phosphorylation in WBM cells (Figure 2A, upper panel), whereas CLCF1, unlike IL-6, failed at inducing STAT3 activation in sorted LSK cells (Figure 2A, lower panel). These results suggest an indirect CLCF1-mediated effect on LSKs. To ascertain this hypothesis, we designed an *in vitro* experiment where CM was collected from CLCF1-primed WBM cells and then used to stimulate freshly isolated WBM (Figure 2B). This experiment revealed that CM derived from CLCF1-treated WBM could expand LSKs to the same extent as direct CLCF1 stimulation (Figure 2C). This prompted us to analyze the supernatants collected from WBM cells stimulated for 24 h with increasing concentrations of CLCF1 using a broad cytokine array. Interestingly, CLCF1 triggered the upregulation of various factors known to regulate hematopoiesis in a dose-dependent manner (Figure 2D; Figure S1). Altogether, these results clearly demonstrate that CLCF1 triggers LSK expansion *in vitro* via the upregulation of pro- and anti-inflammatory cytokines.

### **CLCF1 administration to healthy animals increases the frequency and count of LSKs and myeloid cells.**

Having observed that CLCF1 can lead to the expansion of LSK cells *in vitro*, we next sought to examine the effect of CLCF1 on hematopoiesis *in vivo*. To achieve this objective, we injected 50 or 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of recombinant CLCF1 into C57BL/6 mice daily for 5 consecutive days prior to analyzing the BM, blood and spleen at day 8 post-CLCF1. Administration of 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of CLCF1 resulted in a marked increase in the frequency (Figure 3A) and absolute count (Figure

3B) of BM-derived LSKs. Interestingly, a consistent increase in CD11b<sup>+</sup> cells in the BM, blood and spleen compartments was also noticed (Figure 3C), in contrast to B (CD19<sup>+</sup>) and T (CD3<sup>+</sup>) cells, clearly indicating a preferential effect for CLCF1 on myelopoiesis.

### **CLCF1 accelerates LSK and myeloid cell recovery following sub-lethal irradiation.**

Having assessed the effect of CLCF1 on hematopoiesis in healthy animals, we then evaluated the capacity of CLCF1 in regulating LSK expansion during emergency hematopoiesis induced by sub-lethal total body irradiation. Under such conditions, hematopoiesis recovery usually occurs gradually to reach normal levels in mice one month after the insult is cleared (Neelis et al., 1998). This model is therefore suitable to assess the speed of hematopoiesis recovery following CLCF1 administration. CLCF1 was administered as previously explained prior to BM analysis at days 8 and 28 post-irradiation (Figure 4A). Interestingly, we observed a more than 10-fold increase in the absolute number of LSKs at day 8 compared to PBS treated mice (Figure 4B). Since recovery occurs gradually in this model, no significant differences in LSK counts were observed at day 28 (Figure 4C). Of note, higher counts of total BM and CD11b<sup>+</sup> cells were detected at day 28 in the CLCF1-treated group (Figure 4D), further supporting a role for CLCF1 in myeloid-based hematopoiesis.

### **CLCF1 promotes myelopoiesis following congenic BMT.**

Congenic BMTs are widely used models for studying HSC engraftment and immune reconstitution (Xu et al., 2004; Boieri et al., 2016). To further confirm that CLCF1 enhances HSC expansion with a bias towards myeloid cell regeneration, CLCF1 was administered to mice undergoing congenic BMT (Figure 5A-B). An accelerated recovery of circulating CD45.1<sup>+</sup> cells with a very rapid reconstitution of circulating myeloid cells was observed (Figure 5B). Significant differences were noticed between CLCF1- and PBS-treated mice as soon as two weeks post-transplantation (Figure 5C). In fact, CLCF1-treated mice had circulating counts of CD11b<sup>+</sup> cells at week 2 equivalent to those observed at week 4 in the PBS-treated mice, with almost complete recovery reached at week 4 post-BMT (Figure 5C). Although CLCF1 was initially identified as a B-cell stimulating factor, only a mild B-cell reconstitution effect was

observed with no significant impact on T-cell reconstitution at the tested doses (Figure 5C). In addition, BM analysis at week 4 showed a higher percentage of chimerism in CLCF1-treated mice compared to the PBS or IL-7 groups suggesting enhanced engraftment of HSCs in presence of CLCF1 (Figure 6A). In agreement with the data obtained on circulating CD45.1<sup>+</sup> cells, the BM of CLCF1-treated mice displayed increased absolute counts of total CD45.1<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells (Figure 6A). Notably, higher levels of donor LSKs were detected in the CLCF1-treated mice when compared to control un-irradiated mice at week 4 (Figure 6A), whereas all significant differences were lost by week 9 (Figure 6B). Altogether, our observations using the congenic BMT model confirm the hematopoiesis-stimulating properties of CLCF1 with a myelopoiesis bias.

## **DISCUSSION**

We observed a new role for CLCF1 in stimulating LSK expansion with a bias towards myeloid cell development. Amongst our observations, the high LSK counts observed after a 72 h culture with CLCF1 begs the question: how can CLCF1 promote LSK expansion while restraining their differentiation? In fact, analysis of BM-resident HSCs following congenic BMT revealed increased counts in both long-term (LT)-HSCs and multipotent progenitor cells suggesting both sustained hematopoiesis and a rapid differential potential respectively (Figure S2). A logical explanation for these observations may lay in the CLCF1 mode of action. Analysis of conditioned media collected in response CLCF1-primed WBM cells revealed the presence of well described soluble factors known for their role in hematopoiesis. Among the detected factors, the presence of IL-10 might be of capital importance due to its involvement in promoting HSC self-renewal (Kang et al., 2007). Furthermore, sustained hematopoiesis has been also linked to VEGF activity whereas its genetic ablation results in reduced HSC survival and colony formation capacity (Gerber et al., 2002). Ex-vivo stem cell expansion is nowadays of high clinical interest but its success depends largely on the quality and amount of injected HSCs (Fares et al., 2015). Although beyond the scope of this study, it would be pertinent to assess whether ex-vivo HSC expansion using CLCF1 as a stand-alone strategy could improve long-term HSC engraftment using secondary/tertiary transplantations versus established or new growth factor combinations based on the cytokine array data we obtained.

Myelopoiesis is an important and tightly regulated process insuring sustained formation of monocytes, granulocytes and dendritic cells. Myeloid cells are important players in innate and adaptive immunity and macrophages are primordial for the resolution of inflammation. Our data bring forward new assumptions and hypotheses, which could be of interest for immunotherapies and/or pathologies involving myeloid dysregulation. For instance, BCG vaccination has been recently shown to educate HSCs in order to generate epigenetically-modified macrophages capable of providing better protection against virulent *M. tuberculosis* infection compared to standard naïve macrophages (Kaufmann et al., 2018). It would therefore be interesting to: i) assess CLCF1 expression following BCG administration, and ii) test whether its co-administration with BCG generates an optimal protective innate immunity against tuberculosis. On a different subject, HSC reconstitution during aging is altered by clonal expansion leading to a myeloid dominance during hematopoiesis (Kovtonyuk et al., 2016; Rundberg Nilsson et al., 2016; Chung and Park, 2017). Cytokines secretion following CLCF1 treatment comprises factors associated with the inflammatory profile of aging. In fact, both IL-6 and TNF- $\alpha$  have been reported to be elevated in elderly populations and are strongly secreted in BM cultures stimulated with CLCF1 (Figure 2D) (Kovtonyuk et al., 2016). This suggests that CLCF1 might contribute in promoting myeloid cell development during aging and could therefore represent a potential therapeutic target for the re-establishment of a balanced myelo-/lymphopoiesis. Further studies on hematopoiesis and CLCF1 are therefore warranted to evaluate the clinical relevance of this cytokine.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Isabelle Caron from the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) animal facility for her kind help with the BMT experiments. We thank Gaël Dulude and Danièle Gagné from the IRIC flow-cytometry platform for their help with cell sorting and flow-cytometry analysis. We thank Dr. Christian Beauséjour for its helpful advice and student guidance.

## **FUNDING DISCLOSURE**

This work was supported by a grant from the Merck-Sharp and Dohme Corp to MR and by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant MOP 57832 to JFG. SP was supported by a doctoral scholarship from the Fond de la Recherche en Santé Québec (FRQS).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT**

SP designed and performed *in vitro* experiments; proliferations, STAT3 phosphorylation assays, conditioned media experiments, realised CLCF1 administration in the three set of *in vivo* experiments, analyzed data and wrote the paper. AT designed and helped with the sub-lethal total body irradiation assays. JM and VL participated in CLCF1 production and congenic bone marrow transplant experiments. MS participated in study concept, analysis and interpretation of data. JFG and MR conceived and supervised the project, analyzed data and wrote the paper. All authors contributed to the conception of the study, the analysis of the data and the revision of the manuscript.

## **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Alexander, W.S., Rakar, S., Robb, L., Farley, A., Willson, T.A., Zhang, J.G., et al. (1999). Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9(11), 605-608.
- Beltran, W.A., Zhang, Q., Kijas, J.W., Gu, D., Rohrer, H., Jordan, J.A., et al. (2003). Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8), 3642-3649.
- Bernad, A., Kopf, M., Kulbacki, R., Weich, N., Koehler, G., and Gutierrez-Ramos, J.C. (1994). Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1(9), 725-731.
- Boieri, M., Shah, P., Dressel, R., and Inngjerdingen, M. (2016). The Role of Animal Models in the Study of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and GvHD: A Historical Overview. *Front Immunol* 7, 333. doi: 10.3389/fimmu.2016.00333.
- Chung, S.S., and Park, C.Y. (2017). Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. *Blood Adv* 1(26), 2572-2578. doi: 10.1182/bloodadvances.2017009852.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., et al. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3(9), 867-872. doi: 10.1038/78765.
- Fares, I., Rivest-Khan, L., Cohen, S., and Sauvageau, G. (2015). Small molecule regulation of normal and leukemic stem cells. *Curr Opin Hematol* 22(4), 309-316. doi: 10.1097/MOH.000000000000151.
- Fuhrmann, S., Grabosch, K., Kirsch, M., and Hofmann, H.D. (2003). Distribution of CNTF receptor alpha protein in the central nervous system of the chick embryo. *J Comp Neurol* 461(1), 111-122. doi: 10.1002/cne.10701.
- Gerber, H.P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., et al. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* 417(6892), 954-958. doi: 10.1038/nature00821.



- Hirano, T., Taga, T., Matsuda, T., Hibi, M., Suematsu, S., Tang, B., et al. (1990). Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 8 Suppl 1, 155-166; discussion 166-157. doi: 10.1002/stem.5530080714.
- Ip, F.C., Fu, A.K., Tsim, K.W., and Ip, N.Y. (1995). Cloning of the alpha component of the chick ciliary neurotrophic factor receptor: developmental expression and down-regulation in denervated skeletal muscle. *J Neurochem* 65(6), 2393-2400.
- Kang, Y.J., Yang, S.J., Park, G., Cho, B., Min, C.K., Kim, T.Y., et al. (2007). A novel function of interleukin-10 promoting self-renewal of hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 25(7), 1814-1822. doi: 10.1634/stemcells.2007-0002.
- Kaufmann, E., Sanz, J., Dunn, J.L., Khan, N., Mendonca, L.E., Pacis, A., et al. (2018). BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 172(1-2), 176-190 e119. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.031.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74(1), 1-10.
- Kovtonyuk, L.V., Fritsch, K., Feng, X., Manz, M.G., and Takizawa, H. (2016). Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol* 7, 502. doi: 10.3389/fimmu.2016.00502.
- MacLennan, A.J., Gaskin, A.A., and Lado, D.C. (1994). CNTF receptor alpha mRNA expression in rodent cell lines and developing rat. *Brain Res Mol Brain Res* 25(3-4), 251-256.
- Metcalf, D. (1993). Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood* 82(12), 3515-3523.
- Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gearing, D.P. (1990). Effects of injected leukemia inhibitory factor on hematopoietic and other tissues in mice. *Blood* 76(1), 50-56.
- Murakami, M., Kamimura, D., and Hirano, T. (2004). New IL-6 (gp130) family cytokine members, CLC/NNT1/BSF3 and IL-27. *Growth Factors* 22(2), 75-77.
- Neelis, K.J., Visser, T.P., Dimjati, W., Thomas, G.R., Fielder, P.J., Bloedow, D., et al. (1998). A single dose of thrombopoietin shortly after myelosuppressive total body irradiation prevents pancytopenia in mice by promoting short-term multilineage spleen-repopulating cells at the transient expense of bone marrow-repopulating cells. *Blood* 92(5), 1586-1597.

- Pasquin, S., Chehboun, S., Dejda, A., Meliani, Y., Savin, V., Warner, G.J., et al. (2018). Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity. *Scientific Reports* 8(1), 3990. doi: 10.1038/s41598-018-22400-y.
- Pruijt, J.F., Lindley, I.J., Heemskerk, D.P., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (1997). Leukemia inhibitory factor induces in vivo expansion of bone marrow progenitor cells that accelerate hematopoietic reconstitution but do not enhance radioprotection in lethally irradiated mice. *Stem Cells* 15(1), 50-55. doi: 10.1002/stem.150050.
- Rundberg Nilsson, A., Soneji, S., Adolfsson, S., Bryder, D., and Pronk, C.J. (2016). Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. *PLoS One* 11(7), e0158369. doi: 10.1371/journal.pone.0158369.
- Senaldi, G., Stolina, M., Guo, J., Faggioni, R., McCabe, S., Kaufman, S.A., et al. (2002). Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol* 168(11), 5690-5698.
- Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., et al. (1999). Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20), 11458-11463.
- Xu, H., Exner, B.G., Chilton, P.M., Schanie, C., and Ildstad, S.T. (2004). CD45 congenic bone marrow transplantation: evidence for T cell-mediated immunity. *Stem Cells* 22(6), 1039-1048. doi: 10.1634/stemcells.22-6-1039.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., et al. (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1), 407-411.
- Zou, X., Bolon, B., Pretorius, J.K., Kurahara, C., McCabe, J., Christiansen, K.A., et al. (2009). Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Vet Pathol* 46(3), 514-519. doi: 10.1354/vp.08-VP-0239-B-BC.

**Figure 1. CLCF1 promotes LSK proliferation.** (A) Representative flow-cytometry analysis of LSKs following a 24 h stimulation with different CLCF1 concentrations. (B) Percentages and absolute counts of LSKs displayed as mean of triplicates  $\pm$  S.D. (C) EdU incorporation in LSK cells after 24 h of WBM stimulation with CLCF1. (D) Flow-cytometry analysis of LSKs following 24 and 72 h stimulation with PBS or CLCF1 (100 ng/mL). (E) Absolute LSK counts of the experiment shown in panel D.

**Figure 2. CLCF1 promotes LSK expansion in an indirect fashion.** (A) WBM (upper panel) or FACS-sorted LSKs (lower panel) stimulated with IL-6 (50 ng/ml) or CLCF1 (100 ng/ml). Filled grey histograms represent STAT3 phosphorylation in unstimulated cells. (B) The experimental design used to assess the indirect effect of CLCF1 on BM-derived cell. WBM cells were incubated with PBS or CLCF1 for 4 h, washed then cultured for another 24 h. CM was then transferred to stimulate freshly isolated BM cells for 24 h prior to LSK quantification by flow-cytometry. (C) Absolute LSK counts from the experiment shown in panel B. CLCF1 or CLCF1-derived CM is represented by the black bars whereas white bars represent the PBS control condition. (D) Cytokine/chemokine analysis of CM collected from cells incubated with PBS or CLCF1 for 24 h.

**Figure 3. CLCF1 administration to healthy mice up-regulate LSK and myeloid cell levels in the BM.** (A-B) Frequency and count assessment of LSKs at day 8 post-CLCF1 administration. (C) Absolute counts of BM-, blood- and spleen-resident CD11b<sup>+</sup> cells, CD19<sup>+</sup> cells and CD3<sup>+</sup> cells at day 8. Graphs represent absolute count in mean  $\pm$  S.D (n=5 per group).

**Figure 4. CLCF1 accelerates the recovery of LSKs following sub-lethal irradiation** (A) Schematic overview of CLCF1 injections after total body sub-lethal irradiation. (B) Flow-cytometry analysis and their cognate percentages/absolute counts of BM-derived LSK cells at day 8 (left panel) or day 28 (right panel) compared to PBS-treated mice. (C) Absolute count of total, CD11b<sup>+</sup> and CD19<sup>+</sup> BM cells at day 28. For panels B and C, graphs represent absolute count in mean  $\pm$  S.D (n=5 per group).

**Figure 5. CLCF1 administration increases the level of circulating myeloid cells following congenic BMT.** (A-B) Schematic representation of CLCF1 injections in congenic BMT. Recipient mice received i.p. injections of PBS, IL-7 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or CLCF1 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) every two days for a total period of two weeks. Blood samples were collected weekly starting from week 2 for flow-cytometry analysis. (C) Absolute counts of circulating CD45.1<sup>+</sup>, CD45.1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD45.1<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> and CD45.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells at week 2, 4 and 9 post-transplantation. Graphs represent absolute counts in mean  $\pm$  S.D (n=10/group for week 2 and 4, n=5/group for week 9). Dotted lines indicate mean value of aged-match un-transplanted controls (n=10)  $\pm$  S.D.

**Figure 6. CLCF1 administration after BMT results in increased numbers of BM-resident LSK and myeloid cells.** Recipient mice received i.p. injections of PBS, IL-7 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or CLCF1 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) every two days for two weeks. Five mice per group were sacrificed at week 4 after congenic transplant and 5 mice at week 9 for BM flow-cytometry analysis. Percentages of chimerism (CD45.1/total CD45) and absolute counts of BM CD45.1<sup>+</sup>, CD45.1<sup>+</sup>LSKs, CD45.1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD45.1<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> and CD45.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells at week 4 (A) or week 9 (B). Bar graphs representing the absolute counts in mean  $\pm$  S.D (n=5 per group).

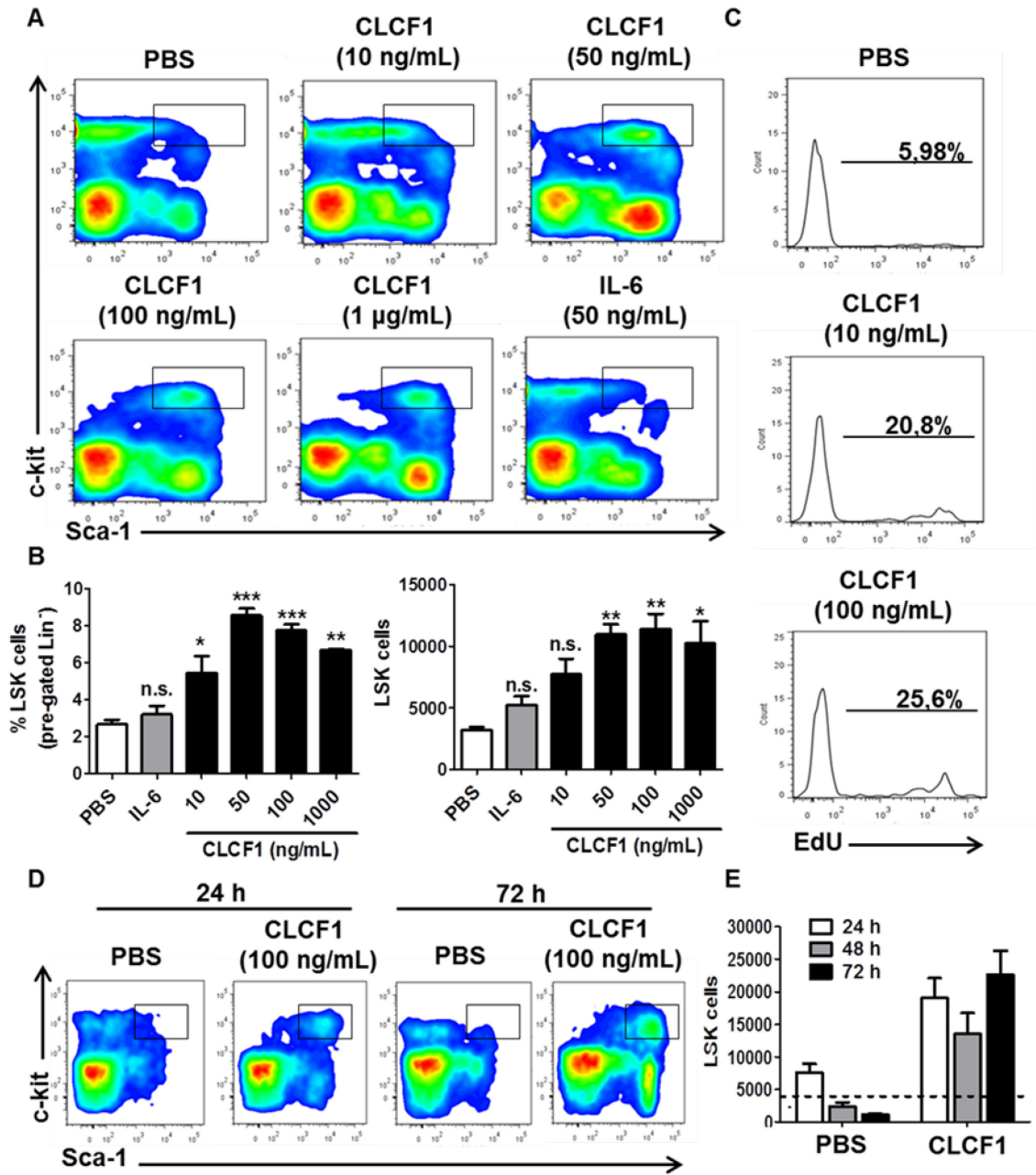


Figure 1. CLCF1 promotes LSK proliferation.

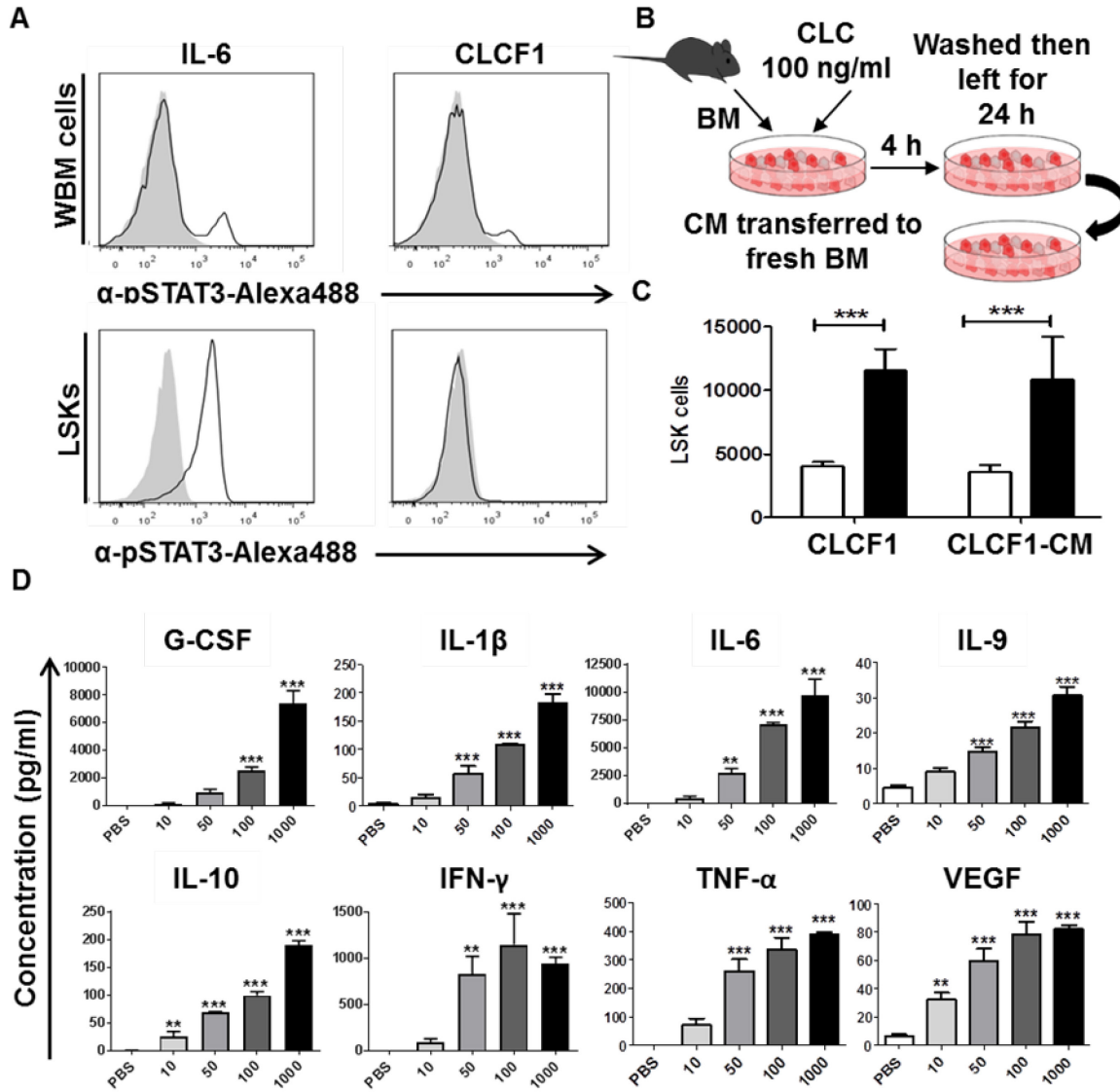
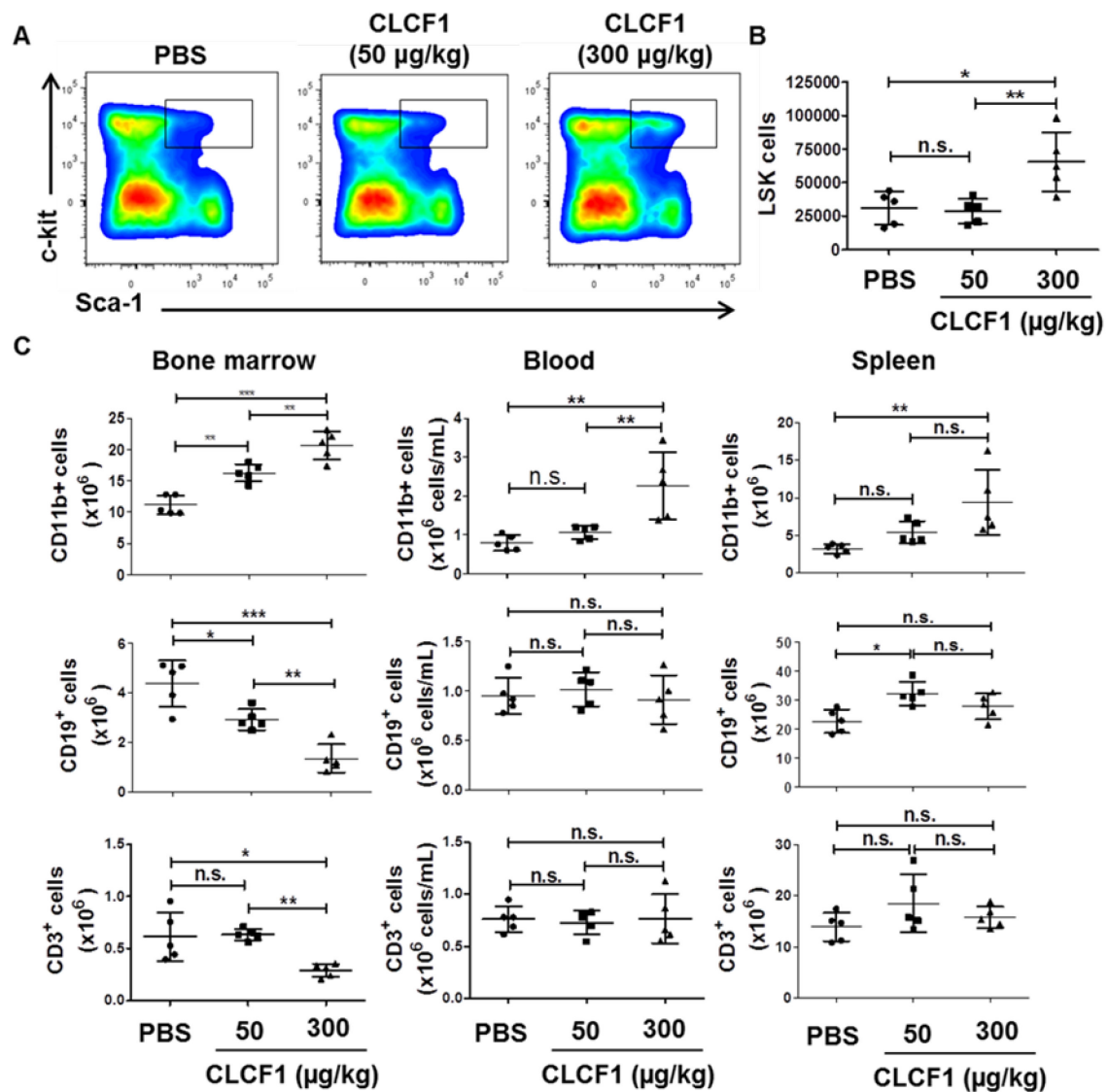


Figure 2. CLCF1 promotes LSK expansion in an indirect fashion.



**Figure 3. CLCF1 administration to healthy mice up-regulate LSK and myeloid cell levels in the BM**

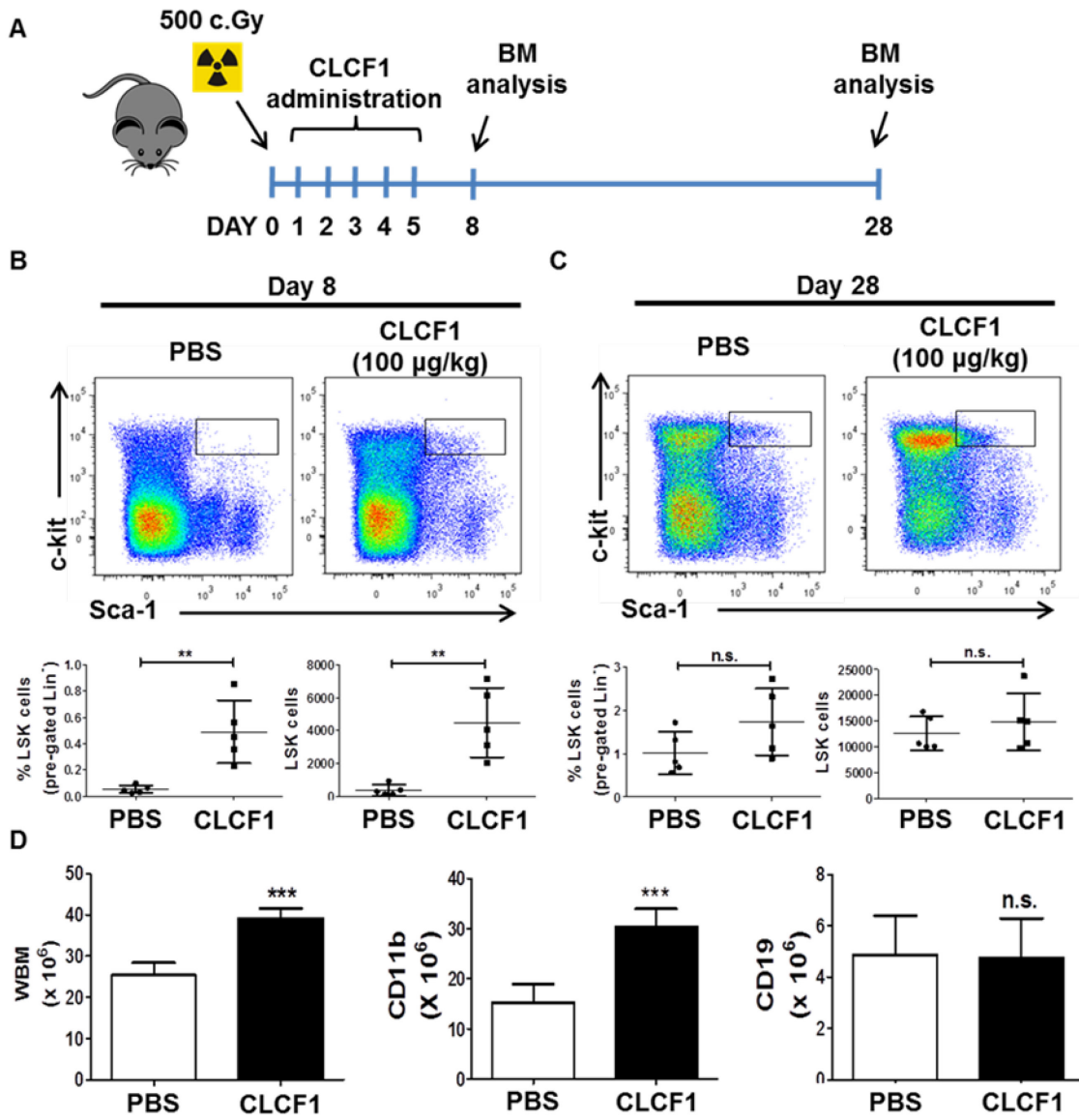
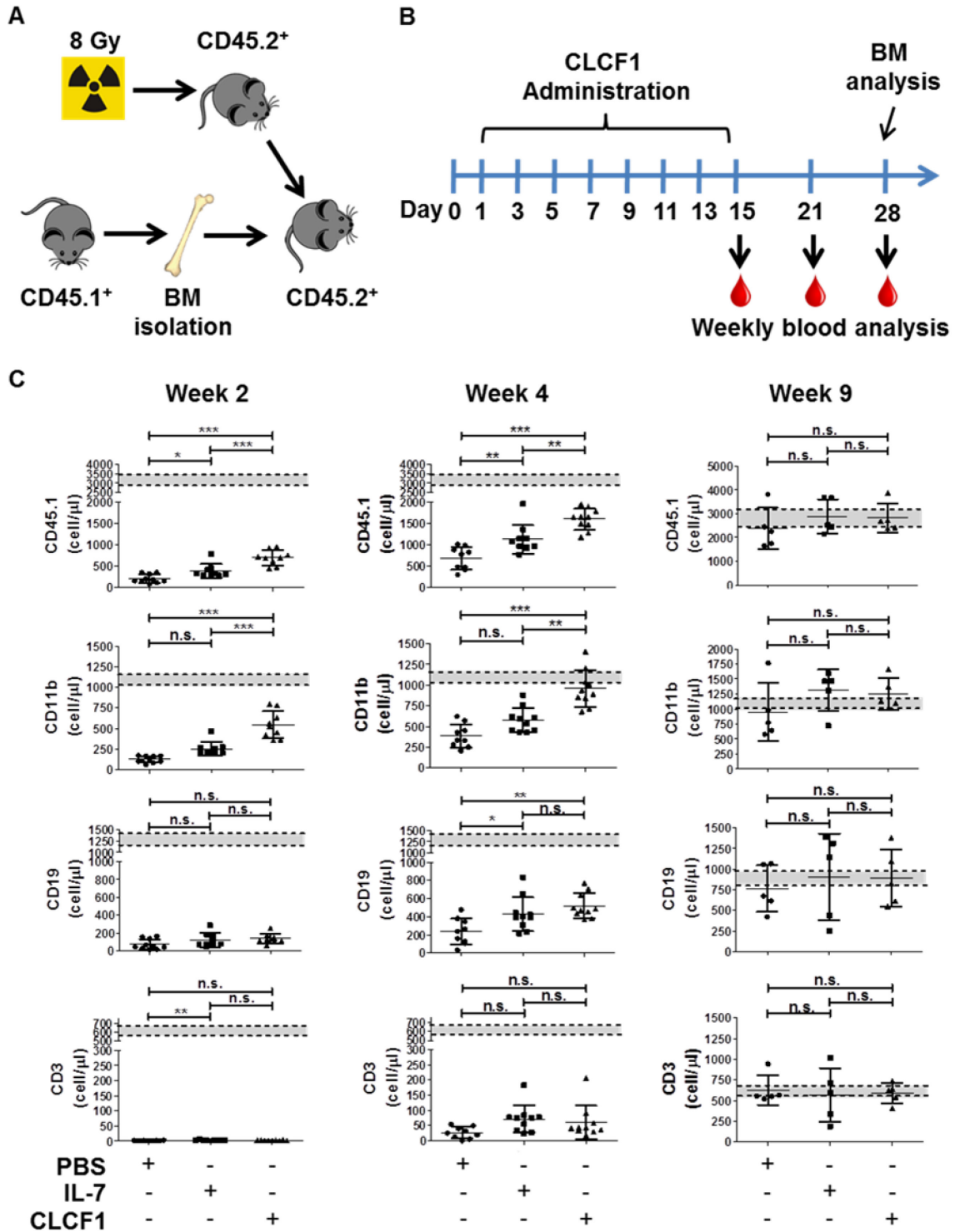
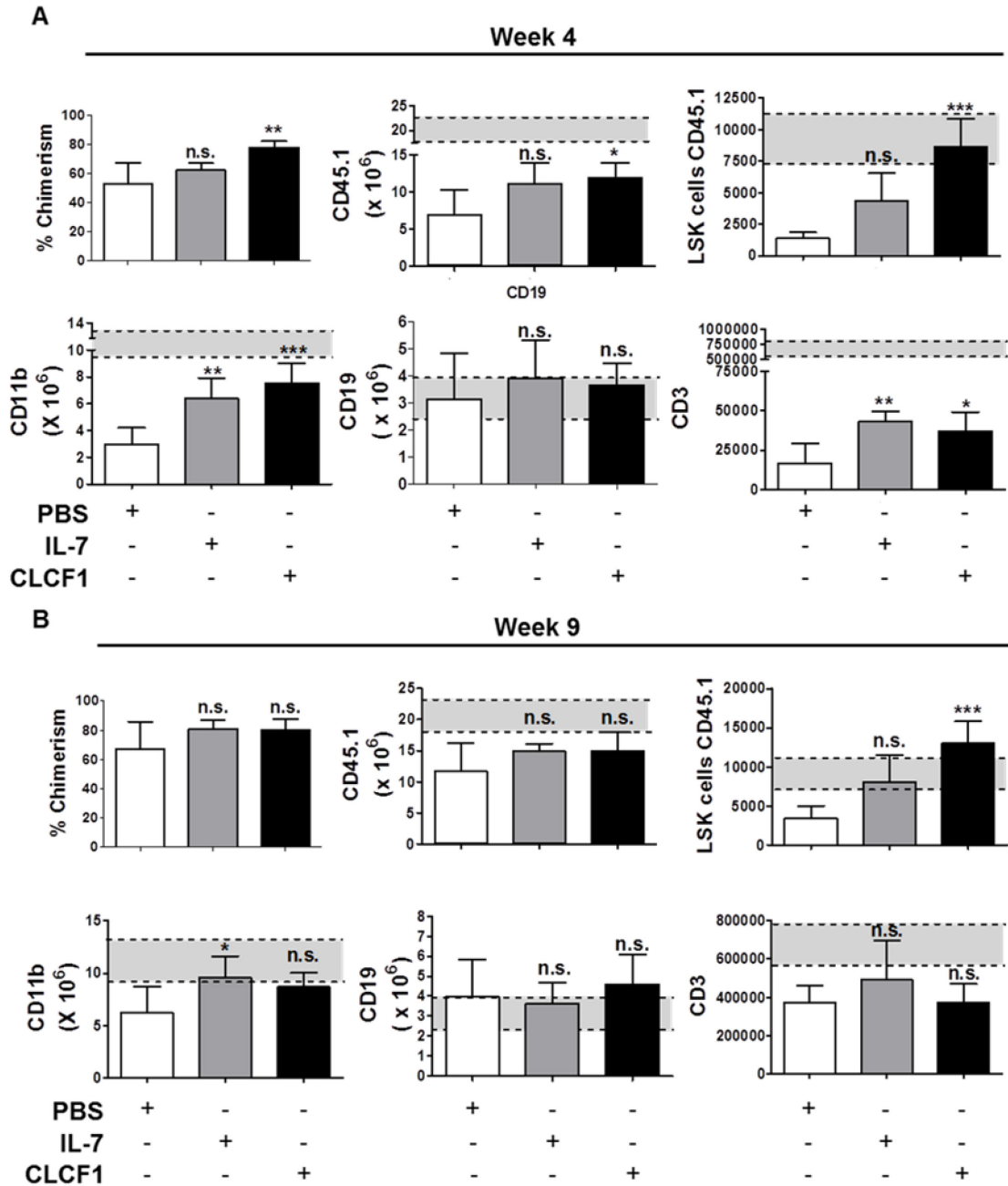


Figure 4. CLCF1 accelerates the recovery of LSKs following sub-lethal irradiation





**Figure 5. CLCF1 administration increases the level of circulating myeloid cells following congenic BMT.**



**Figure 6. CLCF1 administration after BMT results in increased numbers of BM-resident LSK and myeloid cells.**

## **Supplementary Material**

### **Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 Exhibits a Myeloid-Biased Hematopoietic-Stimulating Function**

Sarah Pasquin,<sup>1</sup> Aurélie Tormo,<sup>1,2</sup> Jessica Moreau,<sup>1</sup> Véronique Laplante,<sup>1</sup> Mukut Sharma,<sup>3</sup> Jean-François Gauchat<sup>1\*</sup> and Moutih Rafei<sup>1,4,5\*</sup>

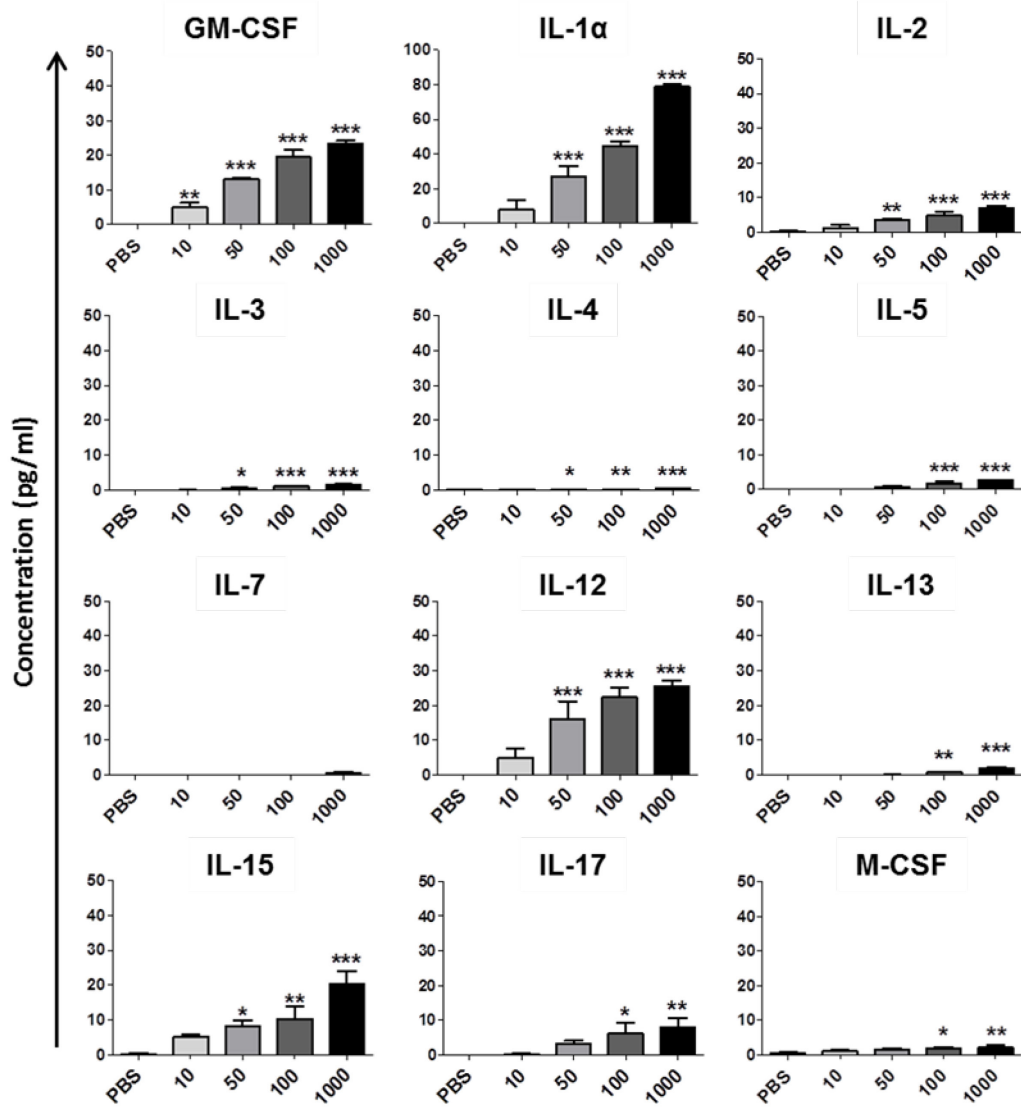
\*To whom correspondence should be addressed:

Dr. Moutih Rafei:

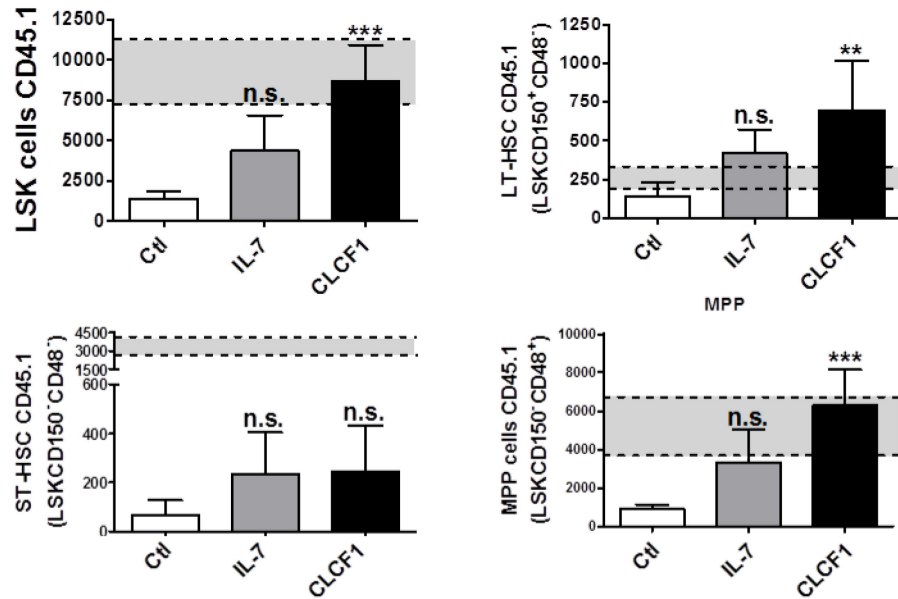
moutih.rafei.1@umontreal.ca;

Dr. Jean-François Gauchat:

jf.gauchat@umontreal.ca.



**Figure S1. Quantification of cytokines secreted by BM cells stimulated with CLCF1.** Cell supernatants of BM cells stimulated with PBS or CM collected from WBM cells stimulated by CLCF1 were analyzed by cytokines/chemokines arrays. Bars represent mean concentration of indicated cytokine or chemokine in pg/mL  $\pm$  S.D.



**Figure S2. CLCF1 administration following congenic BMT results in increased numbers of LT-HSC and MPP cells.** Recipient mice received i.p. injections of PBS, IL-7 (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) or CLCF1 (300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) every second day for two weeks. Five mice per group were sacrificed at week 4 after congenic transplantation for BM analysis by flow-cytometry. Absolute counts of BM CD45.1<sup>+</sup>LSKs, CD45.1<sup>+</sup>LSKsCD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup> (LT-HSCs), CD45.1<sup>+</sup>LSKsCD150<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup> (ST-HSCs) and CD45.1<sup>+</sup>LSKsCD150<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup> (MPPs) were assessed at week 4. Bar graphs represent absolute count in mean  $\pm$  S.D (n=5).



## Article 2.

Pasquin, S., Laplante, V., Kouadri, S., Milasan, A., Mayer, G., Tormo, A.J., Savin, V., Sharma, M., Martel, C., and Gauchat, J.F. (2018). Cardiotrophin-Like Cytokine Increases Macrophage Foam Cell Transition. *The Journal of Immunology*. 8(201): 2462-2471.

Article original publié dans *The Journal of Immunology*

## Cardiotrophin-like Cytokine Increases Macrophage–Foam Cell Transition

Sarah Pasquin,\* Véronique Laplante,\* Shiriane Kouadri,\* Andreea Milasan,<sup>†</sup> Gaétan Mayer,<sup>‡</sup> Aurélie Jeanne Tormo<sup>§</sup>, Virginia Savin<sup>¶</sup>, Mukut Sharma<sup>¶</sup>, Catherine Martel,<sup>†</sup> and Jean-François Gauchat\*

\*Département de Pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3T 1J4, Canada;

<sup>†</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada;

<sup>‡</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada;

<sup>§</sup>ImmuniT, Montreal, Quebec H2X 1Y4, Canada;

<sup>¶</sup>Renal Division, Kansas City Veterans Affairs Medical Center, Kansas City, MO 64128-2226

Address correspondence and reprint requests to Dr. Jean-François Gauchat, Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Pavillon Roger Gaudry S455, 2900 Edouard Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada. E-mail address: [jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca)

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grant MOP- 57832 (to J.-F.G.). C.M. is the recipient of a Fonds de Recherche Santé Québec Research Scholars Career Award Junior 1.

J Immunol 2018; 201:2462-2471; Prepublished online 12 September 2018;  
doi: 10.4049/jimmunol.1800733 <http://www.jimmunol.org/content/201/8/2462>



## Abstract

CLCF1 is a neurotrophic and B cell–stimulating factor belonging to the IL-6 family. Mutations in the gene coding for CLCF1 or its secretion partner CRLF1 lead to the development of severe phenotypes, suggesting important non-redundant roles in development, metabolism, and immunity. Although CLCF1 was shown to promote the proliferation of the myeloid cell line M1, its roles on myeloid activation remain under-investigated. We characterized the effects of CLCF1 on myeloid cells with a focus on monocyte-macrophage and macrophage-foam cell differentiation. CLCF1 injections in mice resulted in a significant increase in CD11b<sup>+</sup> circulating cells, including proinflammatory monocytes. Furthermore, CLCF1 activated STAT3 phosphorylation in bone marrow CD11b<sup>+</sup> cells and in bone marrow-derived macrophages (BMDM). BMDM stimulated with CLCF1 produced a large array of proinflammatory factors comprising IL-6, IL-9, G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-12, CCL5, and CX3CL1. The pattern of cytokines and chemokines released by CLCF1-treated BMDM led us to investigate the role of CLCF1 in foam cell formation. When pretreated with CLCF1, BMDM presented a marked SR-A1 upregulation, an increase in acetylated-low-density lipoprotein uptake, and an elevated triglyceride accumulation. CLCF1-induced SR-A1 upregulation, triglyceride accumulation, and acetylated-low-density lipoprotein uptake could be prevented using ruxolitinib, a JAK inhibitor, indicating that the effects of the cytokine on myeloid cells result from activation of the canonical JAK/STAT signaling pathway. Our data reveal novel biological roles for CLCF1 in the control of myeloid function and identify this cytokine as a strong inducer of macrophage-foam cell transition, thus bringing forward a new potential therapeutic target for atherosclerosis.

**Abbreviations used in this article:** ac-LDL, acetylated-LDL; ApoE, apolipoprotein E; BM, bone marrow; BMDM, BM-derived macrophage; CNTFR, ciliary neurotrophic factor receptor; CT-1, cardiotrophin-1; iNOS, inducible NO synthase; LDL, low-density lipoprotein; MHC II, MHC class II; SR-A1, scavenger receptor A 1; VLDL, very LDL.

## Introduction

Atherosclerosis is an inflammatory, lipid-driven pathology characterized by the development of atherosclerotic plaques in the artery wall (1). When destabilized, these plaques can lead to vessel disruption, causing blood clots and myocardial infarction (2). Atherosclerotic plaques are the result of lipid-rich cellular accumulation by macrophages, leading to the formation of foam cells (3–5). Foam cells have a decreased ability to migrate and are inefficient at clearing dead cells, causing necrotic cores in the vessels. Furthermore, foam cells secrete cytokines that induce the activation of T cells surrounding the atherosclerotic lesions. Activated T cells trigger the migration of vascular smooth muscle cells from the media to the fatty lesions, contributing to plaque destabilization and vessel disruption (6, 7). A better understanding of the biological mechanisms underlying macrophage-foam cell differentiation could lead to the development of effective therapies for the treatment of atherosclerosis.

The gene coding for sortilin, SORT1, has been implicated in low-density lipoprotein (LDL)/cholesterol metabolism, very LDL (VLDL) secretion, and development of atherosclerotic lesions (8, 9). Sortilin, a ligand for apolipoprotein E (ApoE), LDL, and VLDL (10, 11), was recently shown to interact with the composite CLCF1/CRLF1 (12, 13). CLCF1 is an IL-6 family cytokine shown to activate the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) (14–17). Mutations in the gene coding for CLCF1 or its secretion partner CRLF1 are associated with cold-induced sweating or Crisponi syndrome, which have overlapping phenotypes (18–21). Besides dimorphisms, patients tend to suffer from sterile fever episodes in infancy, recurrent infections, life-threatening feeding difficulties, and disinterest in food, suggesting a role for the cytokine in the regulation of inflammation and metabolism (21). In mice, transgenic overexpression of CLCF1 led to splenomegaly and hyper-gammaglobulinemia (15). Hemizygous CLCF1 mice present significantly lower circulating leukocytes (<http://www.mousephenotype.org/>), whereas CRLF1<sup>-/-</sup> mice (defective for CLCF1 secretion) display a strong reduction in bone marrow (BM) hematopoietic stem cells (22). Taken together, these observations strongly suggest under-explored immunoregulatory roles for CLCF1.

Recently, we observed that CLCF1 can interact with ApoE, LDL, and VLDL and that CLCF1 binding to VLDL modulates the activation of CNTFR, suggesting that CLCF1 is involved in

the dysregulation of lipid metabolism (23). This led us to investigate the capability of CLCF1 to activate myeloid cells and induce foam cell differentiation. Results indicate that CLCF1 promotes macrophage activation, scavenger receptor A 1 (SR-A1) expression, LDL influx, and foam cell formation. These observations suggest a novel role of CLCF1 in the pathogenesis of atherosclerosis.

## **Materials and Methods**

### *CLCF1 injections in mice*

Production, purification, and testing of recombinant murine CLCF1 and biotinylated CLCF1 was done as described previously (23). All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Université de Montréal. Six-week-old female C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC). i.p. injections of vehicle (PBS 0.1% BSA) or CLCF1 (50 or 300 µg/kg) were administered daily for 5 d, and mice were euthanized by CO<sub>2</sub> inhalation on day 8. WBC were analyzed by flow cytometry using allophycocyanin-conjugated anti-CD45, allophycocyanin/eFluor 780-conjugated anti-CD11b, PerCP/Cyanine 5.5, anti-Ly-6C and e450-conjugated anti-Ly-6G, and PE-conjugated anti-CD192 (all purchased from Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON). Fluorescence was quantified with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON).

### *CLCF1 binding assays*

BM cells were isolated by flushing femora and tibiae of 6-wk-old female C57BL/6 mice. Freshly isolated BM cells were incubated with biotinylated CLCF1 (1 µg/ml) in PBS 1% BSA for 1 h on ice. CLCF1 binding was quantified using PE-conjugated streptavidin (BD Biosciences) and allophycocyanin/eFluor 780-conjugated anti-CD11b (Thermo Fisher Scientific). Fluorescence was quantified by flow cytometry.

### *CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation*

Freshly isolated BM cells were serum starved for 2 h at 37°C in RPMI 1640 culture medium. Cells were stimulated with IL-6 (50 ng/ml) or CLCF1 (100 ng/ml) for 15 min at 37°C, fixed in 2% formaldehyde, and stained with PE-labeled anti-CD11b mAbs for 30 min on ice. Cells were

permeabilized and stained with allophycocyanin-conjugated anti-p-STAT3 Abs (eBioscience, Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature. Fluorescence was analyzed by flow cytometry.

To generate BM-derived macrophages (BMDM), BM cells were grown at a density of  $1 \times 10^6$  cells/ml for 8 d in presence of recombinant macrophage-CSF (10 ng/ml) (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Macrophage purity was assessed by flow cytometry. At day 8, BMDM were serum starved for 4 h and further stimulated for 4 h at 37°C with CLCF1 (100 ng/ml), IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) (PeproTech), and LPS (100 ng/ml) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) or a combination of IL-4 (50 ng/ml) and IL-13 (30 ng/ml) (PeproTech). BMDM lysates were subjected to 7.5% SDS-PAGE, and proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were probed with anti-STAT1, -STAT3, -p-STAT1 (Tyr701), and -p-STAT3 (Tyr705) Abs (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) and detected using HRP-labeled anti-rabbit IgG Ab (R&D Systems, Cedarlane Laboratories, Burlington, ON).

#### *BMDM polarization assay*

BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated for 24 h with CLCF1 (50 ng/ml), IFN- $\gamma$  (20 ng/ml), and LPS (100 ng/ml) or IL-4 (50 ng/ml) and IL-13 (30 ng/ml). Cells were detached and incubated with purified anti-CD16/CD32 (0.5  $\mu$ g/test) (Thermo Fisher Scientific) for 10 min. Cells were stained with viability marker for 30 min on ice (eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 506; Thermo Fisher Scientific) in combination with one of the following surface Ab mixes: 0.4  $\mu$ g/test of PE anti-CD206 and 0.5  $\mu$ g/test of Alexa Fluor 488 anti-F4/80 (Thermo Fisher Scientific) or 0.1  $\mu$ g/test of PE anti-CD86 (Thermo Fisher Scientific) and 0.1  $\mu$ g/test of Alexa Fluor 488 anti-MHC class II (MHC II) (BD Biosciences). Fluorescence was quantified by flow cytometry.

For intracellular staining, BMDM were stimulated as described above for 18 h. During the last 4 h, cytokine secretion was blocked using brefeldin A (5  $\mu$ g/ml) (Thermo Fisher Scientific). Cells were detached, incubated with purified anti-CD16/CD32 (0.5  $\mu$ g/test) (Thermo Fisher Scientific) for 10 min, and stained with viability marker for 30 min on ice (eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 506; Thermo Fisher Scientific). BMDM were washed; fixed; permeabilized with PBS containing 0.5% saponin, 0.5% BSA, and 0.1% sodium azide; and

stained with purified anti-CD16/CD32, 0.1 µg/test of anti-inducible NO synthase (iNOS)/allophycocyanin (clone: CXNFT; Thermo Fisher Scientific), and 1 µg/test anti-IL-12/IL-23 p40-PE (clone: C17.8; Thermo Fisher Scientific) in permeabilization buffer for 30 min at room temperature.

#### *Arginase-1 quantification assay*

BMDM were stimulated for 18 h with CLCF1, IFN- $\gamma$ /LPS, or IL-4/IL-13 as described above. Cells were harvested, washed, and lysed for 10 min in 10 mM Tris-HCL (pH 7.4) containing 1 mM pepstatin A, 1 mM leupeptin, and 0.4% (w/v) Triton X-100. Arginase activity was then measured using the Arginase Activity Assay Kit (MAK112; Sigma-Aldrich).

#### *Cytokines and chemokines quantification*

BMDM were stimulated for 18 h with CLCF1, IFN- $\gamma$ /LPS, or IL-4/IL-13 as described above. Cell supernatants were collected and analyzed using Eve Technologies 44-Plex Mouse Cytokines/Chemokines Array (Eve Technologies, Calgary, AB). IL-6 production by BMDM was confirmed using quantitative ELISA according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific).

#### *Triglyceride staining*

To induce foam cell formation, BMDM were treated with recombinant CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h, serum starved for 4 h, and further incubated with or without acetylated-LDL (ac-LDL) (100 µg/ml)/cholesterol (5 µM) for 18 h. Accumulation of intracellular triglycerides was first visualized using confocal microscopy; foam cells developed on poly-L-lysine (0.01%)-coated coverslips were washed twice using warm PBS and stained for 10 min with AdipoRed (Lonza, Cedarlane Laboratories, Burlington, ON) according to the manufacturer's protocol. Coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma-Aldrich), supplemented with DAPI nucleus staining (Thermo Fisher Scientific), and observed using an LSM 800 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Toronto, ON). Samples were viewed using a 403/1.4 differential interference contrast oil objective. Quantification of intracellular triglycerides after AdipoRed staining (described above) was assessed using a Victor2 fluorescence microplate reader (PerkinElmer, Woodbridge, ON).

To investigate the roles of SR-A1 in triglyceride accumulation, BMDM were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h in presence or absence of neutralizing anti-SR-A1 (4 µg/ml) (R&D systems, Cedarlane Laboratories). Cells were then serum starved for 4 h and treated with ac-LDL/cholesterol, stained with AdipoRed, and analyzed using a fluorescence microplate reader as described. The same protocol was used to quantify triglycerides following a 24 h stimulation with CLCF1 (100 ng/ml) alone or in presence of ruxolitinib (50 µM) (Selleck Chemicals, Cedarlane Laboratories).

#### *CD36 and SRA-1 quantification*

BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with recombinant CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h. For Western blot analysis, BMDM lysates were subjected to 7.5% SDS-PAGE, and proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were probed with anti-SR-A1 (R&D Systems), anti-CD36 (R&D Systems), or anti-GAPDH Abs (Santa Cruz Biotechnology, San Juan, CA) and detected using HRP-labeled anti-goat IgG Ab (R&D Systems). For flow cytometry experiments, cells were detached and incubated with Fc blocks (purified anti-CD16/CD32 Abs; 0.5 µg/test) (Thermo Fisher Scientific) for 10 min. Cells were stained for 30 min on ice with PE anti-SR-A1 (Thermo Fisher Scientific) or allophycocyanin anti-CD36 Abs (Thermo Fisher Scientific), washed, and analyzed for fluorescence.

#### *Ac-LDL uptake*

BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with recombinant CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h, serum starved for 4 h in RPMI culture medium, and further incubated with Alexa Fluor 488-conjugated ac-LDL (1 µg/ml; Thermo Fisher Scientific) for 4 h. Cells were detached, washed, and analyzed using flow cytometry. Ac-LDL uptake was assessed when BMDM were treated with CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h in presence or absence of neutralizing anti-SR-A1 (4 µg/ml) (R&D Systems) or ruxolitinib (50 µM) (Selleck Chemicals).

#### *Statistical analysis*

For statistical analysis, unpaired Student t test and one-way or two-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test were used where appropriate. Results presented in figures are marked

using asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . Data were analyzed using GraphPad prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

## Results

### *CLCF1 leads to an increase in myeloid cell fraction in mice*

Initial analysis for CLCF1-responsive cells indicated that it could activate the myeloid cell line M1 (14). To investigate whether CLCF1 affects primary myeloid cells, we assessed the effect of CLCF1 administration in C57BL/6 mice (Fig. 1). We observed an increase in blood myeloid cell fraction (Fig. 1A). Specifically, CLCF1 injections in mice led to a significant increase in granulocytes and proinflammatory monocytes defined as  $CD11b^{+}Gr1^{high}$  and  $CD11b^{+}Ly6C^{high}CCR2^{+}$  cells, respectively, whereas no significant changes were observed in anti-inflammatory monocytes ( $CD11b^{+}Ly-6C^{low}CCR2^{-}$ ) (Fig. 1A). These observations suggest a role for CLCF1 in the expansion and/or mobilization of the proinflammatory monocyte subset without favoring the release of patrolling monocytes in the periphery.

Next, we sought to determine whether CLCF1 could bind and trigger JAK/STAT signaling in primary mouse myeloid cells. Using biotinylated CLCF1, we observed that CLCF1 binds to a large fraction of BM  $CD11b^{+}$  cells (Fig. 1B). Furthermore, stimulation of freshly isolated BM cells with CLCF1 followed by flow cytometry analysis of STAT3 phosphorylation in  $CD11b^{+}$  cells indicated that CLCF1 could trigger JAK/STAT signaling in myeloid cells (Fig. 1C).

### *CLCF1 activates BMDM but does not induce a definite classical or alternative polarization phenotype*

As observed with freshly isolated BM  $CD11b^{+}$  cells, we detected STAT3 phosphorylation in response to CLCF1 in BMDM at a level equivalent to that induced by the combination of IFN- $\gamma$ /LPS (Fig. 2A). Furthermore, stimulation with CLCF1 for 4 h also resulted in upregulation of STAT1 phosphorylation (Fig. 2B).

Cytokines of the IL-6/IL-12 family are known to regulate macrophage polarization (24, 25). To investigate the effect of CLCF1 on macrophage phenotypes, we analyzed its effect on BMDM *in vitro*. In contrast to the proinflammatory IFN- $\gamma$ /LPS or anti-inflammatory IL-4/IL-13

combinations, stimulation with CLCF1 did not result in increased levels of cell surface CD86 or CD206 (Fig. 2C, 2D). Interestingly, BMDM stimulation with CLCF1 led to a detectable increase of MHC II expression and a significant upregulation of F4/80 surface marker (Fig. 2E, 2F). In line with a lack of effect on CD86 or CD206 expression, *in vitro* stimulation of BMDM by CLCF1 does not cause significant changes in iNOS or Arginase-1 levels (Fig. 2G, 2H), confirming that CLCF1 did not induce prototypic pro- or anti-inflammatory phenotypes.

CLCF1-induced activation of STAT1 and STAT3 combined with the upregulation of MHC II and F4/80 surface expression underscores the ability of this cytokine to activate BMDM without inducing a classical or alternative polarization.

#### *BMDM stimulation by CLCF1 leads to the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines*

Having observed that CLCF1 activates BMDM, we compared IFN- $\gamma$ /LPS, IL-4/IL-13, and CLCF1-stimulated BMDM culture medium for cytokine and chemokine production (Fig. 3A). High levels of IL-6, IL-9, G-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12(p40), and IL-12(p70) were detected in CLCF1-stimulated BMDM supernatants (Fig. 3A). We observed that CLCF1 triggered the production of IL-10, indicating that the recombinant CLCF1 also induced anti-inflammatory cytokine release (Fig. 3A). As observed with IFN- $\gamma$ /LPS stimulation, incubation with CLCF1 resulted in a strong secretion of various proinflammatory chemokines, such as CCL5, CCL1, CX3CL1, CCL2, and members of the MIP family (Fig. 3A). Secretion of chemokines such as CCL2 from CLCF1-stimulated macrophages may contribute to the mobilization of CCR2<sup>+</sup> proinflammatory monocytes observed in mice following systemic administration of CLCF1 (Fig. 1A). The increase in IL-12 production (p40 and p70) following CLCF1 stimulation was confirmed by intracellular p40 staining and flow cytometry (Fig. 3B). High levels of CLCF1-induced IL-6 secretion were confirmed by ELISA (Fig. 3C).

#### *CLCF1 promotes foam cell formation in vitro*

The cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, and IL-1 $\beta$  together with the chemokines CCL5 and CX3CL1 have been implicated in foam cell formation and atherosclerosis. Whereas CCL5 and CX3CL1



are important in promoting chemoattraction of immune cells in atherosclerotic lesions, neutralization of TNF- $\alpha$ , IL-6, or IL-12 in mouse models of atherosclerosis results in a significant reduction of the pathology (26-31). Furthermore, a mAb against IL-1 $\beta$  (canakinumab) has provided promising results in the phase 3 clinical trial (32). These results, together with our recent observations that CLCF1 binds apoE and interacts with serum lipoproteins, prompted us to investigate the effect of CLCF1 on lipid uptake by and differentiation of macrophages into foam cells.

Intracellular triglyceride staining analyzed by confocal microscopy showed that a larger fraction of BMDM pretreated with CLCF1 forms foam cells following exposure to ac-LDL compared with untreated BMDM (Fig. 4A). Lipid quantification indicated a 2-fold increase in total intracellular triglycerides when macrophages were prestimulated with 100 ng/ml of CLCF1 (Fig. 4B). Next, we analyzed LDL uptake by macrophages using flow cytometry and Alexa Fluor 488-conjugated ac-LDL. A 24 h stimulation using CLCF1 prior to treatment with ac-LDL was sufficient to significantly increase LDL uptake by BMDM (Fig. 4C). Taken together, these data indicate that CLCF1 promotes macrophage-foam cell transition through an increase in lipoprotein uptake.

#### *CLCF1 promotes lipid uptake through the upregulation of SR-A1*

CD36 and SR-A1 are two scavenger receptors playing key roles in the uptake of ac-LDL and oxidized-LDL by macrophages (33). To investigate how CLCF1 stimulates lipid uptake by macrophages and increases macrophage-foam cell differentiation, we evaluated the capacity of the cytokine to regulate CD36 and SR-A1 expression. Analysis of CD36 expression following CLCF1 treatment using Western blotting and flow cytometry failed to reveal modulations of CD36 levels (Fig. 5B). A similar analysis for SR-A1 indicated that both total and cell surface levels of SR-A1 were upregulated by CLCF1 (Fig. 5A, 5B). Blockade of SR-A1 using a neutralizing mAb resulted in an almost complete inhibition of the effect of CLCF1 on ac-LDL uptake (Fig. 5C). Triglyceride accumulation in macrophages was also significantly reduced in the presence of anti-SR-A1 Ab (Fig. 5D). These results suggest that CLCF1 promotes foam cell formation through upregulation of SR-A1 expression.

### *CLCF1 induces foam cell formation through the activation of the JAK/STAT pathway*

CLCF1 activates a receptor comprising the signaling chains gp130 and with nonsignaling CNTFR $\alpha$  (16). The heterodimerization of gp130 and LIFR $\beta$  is known to trigger the JAK/STAT signaling pathway (17, 34). CLCF1 was previously shown to induce the activation of JAK/STAT signaling pathway in neuronal and non-neuronal cells such as glomeruli and podocytes (16, 17, 35). Because we observed a significant activation of STAT1 and STAT3 following stimulation of BMDM by CLCF1, we evaluated the impact of ruxolitinib, a JAK1 and 2 inhibitor, on the capacity of CLCF1 to upregulate SR-A1 expression and increase foam cell differentiation. Interestingly, inclusion of ruxolitinib was sufficient to abolish SR-A1 upregulation following CLCF1 stimulation of BMDM (Fig. 6A). Furthermore, inhibiting JAK activation led to a strong decrease in ac-LDL uptake observable by flow cytometry (Fig. 6B) as well as to a lower triglycerides accumulation in foam cells observable by fluorescence (Fig. 6C). These results indicate that myeloid cell activation by CLCF1 requires JAK/STAT signaling.

### **Discussion**

Immunoregulatory functions for CLCF1 are indicated by observations of transgenic mice overexpressing CLCF1 or CLCF1-haplodeficient mice (<http://mousephenotype.org>) (15). In this report, we investigated its effect on myeloid cells. We observed a significant increase in circulating proinflammatory monocytes following CLCF1 injections in mice, suggesting a heretofore unreported biological role of this cytokine in myeloid activation and regulation. While assessing the effect of CLCF1 on BMDM, we observed that it stimulated STAT1 and STAT3 phosphorylation but failed to induce a classical or alternative activation similar to those triggered by IFN- $\gamma$ /LPS or IL-4/IL-13. Although no prototypic polarization phenotype was discerned in terms of surface marker expression pattern, analysis of cytokine secretion revealed a strong production of proinflammatory cytokines following stimulation by CLCF1. Interestingly, CLCF1 also triggered a significant production of IL-10, implying a balance between activation of pro- and anti-inflammatory BMDM phenotypes.

Macrophages are implicated in both innate and adaptive immunity; they have crucial roles in the amplification as well as in the resolution of inflammation (36). Impaired macrophage polarization can induce an excessive inflammatory response. Mutations in the genes coding for

CLCF1 and CRLF1 are associated with severe syndromes with repeated episodes of sterile fever and a high probability of death during infancy. Patient phenotypes suggest an impaired inflammatory response in absence of circulating CLCF1 that could involve macrophage dysregulation. Further investigation of the role of CLCF1 in myeloid regulation could provide a better understanding of hyperthermia episodes in Crisponi syndrome patients.

CLCF1 belongs to a subgroup of cytokines of the IL-6 family that share the heterodimeric receptor gp130/LIFR $\beta$  as a signaling complex (LIF, CNTF, cardiotrophin-1 [CT-1], Oncostatin M, and CLCF1) (37). Among these, CLCF1, CNTF, and CT-1 share strong sequence homology. Numerous lines of evidence point to CNTF and CT-1 as important regulators of lipid homeostasis, adipogenesis, and glucose uptake (37, 38). Recently, we demonstrated a direct interaction between lipoproteins and CLCF1, indicating that, like CNTF and CT-1, this cytokine could be implicated in lipid and metabolic regulation (23). This, combined with the profile of cytokines and chemokines produced by CLCF1-treated BMDM, prompted us to investigate the role of CLCF1 in foam cell formation. Supernatants of CLCF1-treated BMDM comprised TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$ , CCL5, and CX3CL1 (Fracktaline), which have been extensively studied either for their deleterious roles in atherosclerosis and/or for their capacity to induce macrophage–foam cell transition (31). *In vitro*, CLCF1 is a potent inducer of macrophage–foam cell transition; CLCF1 induced a doubling of triglycerides accumulation in macrophages paralleled by a significant increase in ac-LDL uptake. Analysis of CD36 and SR-A1 expression and contribution suggests that the effect of CLCF1 on lipoprotein uptake was essentially mediated through an upregulation of SR-A1 expression. This scavenger receptor is known to be responsible for cholesterol accumulation in macrophages during atherosclerosis through the uptake of modified LDL. Studies in murine atherosclerosis models suggest that SR-A1 is an important factor for plaque development; SR-A1<sup>-/-</sup>ApoE<sup>-/-</sup> mice have been shown to present significantly lower atherosclerotic lesions than ApoE<sup>-/-</sup> mice (39). Therefore, the ability of CLCF1 to upregulate the expression of SR-A1 on murine macrophages surface points to this cytokine as a potential contributor to foam cell formation in pathological settings.

Foam cells are key players in the development of atherosclerotic lesions. They trigger the development of necrotic cores and sustain the recruitment of activated immune cells to the blood

vessel wall intima. A high count of foam cells in the intima has been correlated with the presence of vulnerable atherosclerotic plaques. Therapeutic strategies aimed at decreasing lipid-rich accumulation in the vessels are now standard for the prevention and treatment of cardiovascular diseases (40). Approaches based on the control of cytokine-induced inflammation are emerging (32). Although statins are efficient in preventing atherosclerosis by the modulation of cholesterol metabolism, controlling the maladaptive immune component of the pathology remains to be addressed. In this study, we observed that 1) CLCF1 promotes higher numbers of proinflammatory circulating monocytes in mice, 2) CLCF1 induces the secretion of deleterious proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  by macrophages, and 3) CLCF1 stimulates the formation of foam cells. Therefore, our results identify CLCF1 as a potential therapeutic target in atherosclerosis for further investigations using preclinical models of cardiovascular diseases. Combining CLCF1 blockade using neutralizing Abs or cytokine traps (41) along with strategies to decrease lipid-rich accumulation in blood vessels such as statins may increase their therapeutic efficacy. In conclusion, we have identified a role for CLCF1 in myelopoiesis, macrophage activation, and macrophage-foam cell transition, suggesting a role for this cytokine in atherosclerosis and cardiovascular diseases.

### **Acknowledgments**

We thank the Institute for Research in Immunology and Cancer genomic platform for the DNA sequencing. We thank Dr. Jean-Philippe Gratton and Chantale Deslile (Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal) for kind help with confocal microscopy experiments and Dr. Armelle LeCampion (Flow Cytometry Core Facility, Université de Montréal) for support with flow cytometry.

### **Disclosures**

The authors have no financial conflicts of interest.

## References

1. Sergin, I., and B. Razani. 2014. Self-eating in the plaque: what macrophage autophagy reveals about atherosclerosis. *Trends Endocrinol. Metab.* 25: 225–234.
2. Hansson, G. K., A. K. Robertson, and C. Söderberg-Nauclér. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 1: 297–329.
3. Dickhout, J. G., S. Basseri, and R. C. Austin. 2008. Macrophage function and its impact on atherosclerotic lesion composition, progression, and stability: the good, the bad, and the ugly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 1413–1415.
4. Moore, K. J., and I. Tabas. 2011. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 145: 341–355.
5. Moore, K. J., F. J. Sheedy, and E. A. Fisher. 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13: 709–721.
6. Dzau, V. J., R. C. Braun-Dullaeus, and D. G. Sedding. 2002. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 8: 1249–1256.
7. Bennett, M. R., S. Sinha, and G. K. Owens. 2016. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ. Res.* 118: 692–702.
8. Musunuru, K., A. Strong, M. Frank-Kamenetsky, N. E. Lee, T. Ahfeldt, K. V. Sachs, X. Li, H. Li, N. Kuperwasser, V. M. Ruda, et al. 2010. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 466: 714–719.
9. Kathiresan, S., O. Melander, C. Guiducci, A. Surti, N. P. Burt, M. J. Rieder, G. M. Cooper, C. Roos, B. F. Voight, A. S. Havulinna, et al. 2008. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. [Published erratum appears in 2008 *Nat. Genet.* 40: 1384.] *Nat. Genet.* 40: 189–197.
10. Patel, K. M., A. Strong, J. Tohyama, X. Jin, C. R. Morales, J. Billheimer, J. Millar, H. Kruth, and D. J. Rader. 2015. Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ. Res.* 116: 789–796.
11. Kjolby, M., O. M. Andersen, T. Breiderhoff, A. W. Fjorback, K. M. Pedersen, P. Madsen, P. Jansen, J. Heeren, T. E. Willnow, and A. Nykjaer. 2010. Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab.* 12: 213–223.

12. Larsen, J. V., M. Hansen, B. Møller, P. Madsen, J. Scheller, M. Nielsen, and C. M. Petersen. 2010. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol. Cell. Biol.* 30: 4175–4187.
13. Larsen, J. V., A. M. Kristensen, L. T. Pallesen, J. Bauer, C. B. Vægter, M. S. Nielsen, P. Madsen, and C. M. Petersen. 2016. Cytokine-like factor 1, an essential facilitator of cardiotrophin-like cytokine:ciliary neurotrophic factor receptor a signaling and sorLA-mediated turnover. *Mol. Cell. Biol.* 36: 1272–1286.
14. Senaldi, G., B. C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C. L. Shaklee, et al. 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11458–11463.
15. Senaldi, G., M. Stolina, J. Guo, R. Faggioni, S. McCabe, S. A. Kaufman, G. Van, W. Xu, F. A. Fletcher, T. Boone, et al. 2002. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J. Immunol.* 168: 5690–5698.
16. Elson, G. C., E. Lelièvre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A. B. de Coignac, Y. Delneste, J. Y. Bonnefoy, et al. 2000. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.* 3: 867–872.
17. Lelièvre, E., H. Plun-Favreau, S. Chevalier, J. Froger, C. Guillet, G. C. Elson, J. F. Gauchat, and H. Gascan. 2001. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J. Biol. Chem.* 276: 22476–22484.
18. Crisponi, L., G. Crisponi, A. Meloni, M. R. Toliat, G. Nurnberg, G. Usala, M. Uda, M. Masala, W. Hohne, C. Becker, et al. 2007. Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 971–981.
19. Dagoneau, N., S. Bellais, P. Blanchet, P. Sarda, L. I. Al-Gazali, M. Di Rocco, C. Huber, F. Djouadi, C. Le Goff, A. Munnich, and V. Cormier-Daire. 2007. Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 966–970.

20. Rousseau, F., J. F. Gauchat, J. G. McLeod, S. Chevalier, C. Guillet, F. Guilhot, I. Cognet, J. Froger, A. F. Hahn, P. M. Knappskog, et al. 2006. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10068–10073.
21. Hahn, A. F., P. E. Waaler, P. H. Kvistad, J. S. Bamforth, J. H. Miles, J. G. McLeod, P. M. Knappskog, and H. Boman. 2010. Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J. Neurol. Sci.* 293: 68–75.
22. Alexander, W. S., S. Rakar, L. Robb, A. Farley, T. A. Willson, J. G. Zhang, L. Hartley, Y. Kikuchi, T. Kojima, H. Nomura, et al. 1999. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr. Biol.* 9: 605–608.
23. Pasquin, S., S. Chehboun, A. Dejda, Y. Meliani, V. Savin, G. J. Warner, R. Bosse, A. Tormo, G. Mayer, M. Sharma, et al. 2018. Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity. *Sci. Rep.* 8: 3990.
24. Fernando, M. R., J. L. Reyes, J. Iannuzzi, G. Leung, and D. M. McKay. 2014. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One* 9: e94188.
25. Bastos, K. R., C. R. Marinho, R. Barboza, M. Russo, J. M. Alvarez, and M. R. D’Impe’rio Lima. 2004. What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes Infect.* 6: 630–636.
26. Merhi-Soussi, F., B. R. Kwak, D. Magne, C. Chadjichristos, M. Berti, G. Pelli, R. W. James, F. Mach, and C. Gabay. 2005. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 66: 583–593.
27. Schieffer, B., T. Selle, A. Hilfiker, D. Hilfiker-Kleiner, K. Grote, U. J. Tietge, C. Trautwein, M. Luchtefeld, C. Schmittkamp, S. Heeneman, et al. 2004. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110: 3493–3500.
28. Davenport, P., and P. G. Tipping. 2003. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 163: 1117–1125.

29. Veillard, N. R., B. Kwak, G. Pelli, F. Mulhaupt, R. W. James, A. E. Proudfoot, and F. Mach. 2004. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circ. Res.* 94: 253–261.
30. Lesnik, P., C. A. Haskell, and I. F. Charo. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 111: 333–340.
31. Ramji, D. P., and T. S. Davies. 2015. Cytokines in atherosclerosis: key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26: 673–685.
32. Ridker, P. M., J. G. MacFadyen, T. Thuren, B. M. Everett, P. Libby, and R. J. Glynn, CANTOS Trial Group. 2017. Effect of interleukin-1b inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 390: 1833–1842.
33. Greaves, D. R., and S. Gordon. 2009. The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J. Lipid Res.* 50(Suppl.): S282–S286.
34. Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334: 297–314.
35. Sharma, M., J. Zhou, J. F. Gauchat, R. Sharma, E. T. McCarthy, T. Srivastava, and V. J. Savin. 2015. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Transl. Res.* 166: 384–398.
36. Sica, A., and A. Mantovani. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122: 787–795.
37. Pasquin, S., M. Sharma, and J. F. Gauchat. 2016. Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism. *Cytokine* 82: 122–124.
38. Pasquin, S., M. Sharma, and J. F. Gauchat. 2015. Ciliary neurotrophic factor (CNTF): new facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26: 507–515.
39. Suzuki, H., Y. Kurihara, M. Takeya, N. Kamada, M. Kataoka, K. Jishage, O. Ueda, H. Sakaguchi, T. Higashi, T. Suzuki, et al. 1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292–296.



40. Katsiki, N., A. D. Giannoukas, V. G. Athyros, and D. P. Mikhailidis. 2018. Lipid-lowering treatment in peripheral artery disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 39: 19–26.
41. Economides, A. N., L. R. Carpenter, J. S. Rudge, V. Wong, E. M. Koehler-Stec, C. Hartnett, E. A. Pyles, X. Xu, T. J. Daly, M. R. Young, et al. 2003. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat. Med.* 9: 47–52.

## Figures Legends

**FIGURE 1. CLCF1 increases circulating myeloid cells and activates CD11b+ BM cells. (A)** C57BL/6 mice were injected daily for 5 d (i.p.) with vehicle or CLCF1 at the doses indicated. At day 8, percentages of circulating CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells were assessed by flow cytometry. Left panel shows representative plots of CD11b fluorescent signal on pre-gated CD45<sup>+</sup> cells. Right and lower panels show absolute count of WBC, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>high</sup>, CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>high</sup>CCR2<sup>+</sup>, and CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly-6C<sup>low</sup>CCR2<sup>-</sup> cells  $\pm$  SD; n = 5 mice per group. **(B)** Freshly isolated BM cells ( $2 \times 10^5$  cells per condition) were incubated with biotinylated-CLCF1 (1  $\mu$ g/ml). Cells were then stained with PE-labeled streptavidin and allophycocyanin/e780-labeled anti-CD11b mAbs. Fluorescence was assessed by flow cytometry. Histogram illustrates streptavidin/PE fluorescence intensity of pre-gated CD11b<sup>+</sup> cells; tinted gray histograms represent cells incubated with PE-streptavidin alone. **(C)** BM cells ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated for 15 min with PBS, IL-6 (50 ng/ml), or CLCF1 (100 ng/ml). STAT3 phosphorylation was assessed by flow cytometry using PE-labeled anti-CD11b and allophycocyanin-labeled p-STAT3 mAbs. Plots represent p-STAT3 signal of pre-gated CD11b<sup>+</sup> cells. Statistical significance was assessed using ANOVA test. \*\*p < 0.01.

**FIGURE 2. CLCF1 activates p-STATs in BMDM without inducing a prototypic polarization phenotype. (A and B)** p-STAT1 and p-STAT3 activation following 4 h stimulation of  $1 \times 10^6$  BMDM with macrophage-CSF, IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) plus LPS (100 ng/ml), IL-4 (50 ng/ml) plus IL-13 (30 ng/ml), or CLCF1 (100 ng/ml) was measured by Western blotting. Blots were probed with specific Abs against **(A)** STAT3 p-Tyr705 (upper panel), STAT3 (lower panel) or **(B)** STAT1 p-Tyr701 (upper panel), STAT1 (lower panel), and HRP-labeled secondary Abs **(C–F)**. BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated for 24 h with cytokines as indicated above. Receptor surface expression was assessed by flow cytometry using **(C)** PE-labeled anti-CD86 mAbs, **(D)** PE-labeled anti-CD206 mAbs, **(E)** Alexa Fluor 488-labeled anti-MHC II mAbs, or **(F)** Alexa Fluor 488-labeled anti-F4/80 mAbs. In left panels, filled gray histograms represent fluorescent signals from macrophage-CSF-treated cells, dotted lines represent IFN- $\gamma$ /LPS-stimulated cells, long dashed lines indicate IL-4/IL-13-stimulated cells, and solid black lines represent CLCF1-stimulated cells. Bar graphs in right panels show average mean fluorescence intensities of triplicates  $\pm$  SD. **(G)** iNOS production by BMDM was assessed

by flow cytometry using PE-labeled anti-iNOS mAbs. Cells were stimulated using indicated cytokines for 18 h, and brefeldin A (5  $\mu$ g/ml) was added for 4 h. Cells were detached, fixed, permeabilized, stained, and fluorescence was quantified. **(H)** BMDM were stimulated as described for 18 h, and cell lysates were analyzed for Arginase-1 activity using a colorimetric enzymatic assay. Bars represent mean Arginase-1 activity  $\pm$  SD. Statistical significance was assessed using ANOVA test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**FIGURE 3. CLCF1 induces secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. (A)** Cell culture medium of BMDM stimulated as indicated for 24 h were analyzed by Cytokines/Chemokines array. Bars represent mean concentration of indicated cytokine or chemokine in picograms per milliliter  $\pm$  SD. **(B)** IL-12(p40) production by BMDM was assessed by flow cytometry using Alexa Fluor 647-labeled anti-IL-12p40 mAbs. Cells ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with cytokines for 18 h as indicated; brefeldin A (5  $\mu$ g/ml) was added in the last 4 h. Cells were detached, fixed, permeabilized, and stained, and fluorescence was analyzed by flow cytometry. **(C)** IL-6 secretion by BMDM ( $1 \times 10^6$ ) was quantified by ELISA. Bar graphs represent mean IL-6 concentrations in nanograms per milliliter  $\pm$  SD. Statistical significance was assessed using ANOVA test. \* $p, 0.05$ , < \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ‡ data above range of standard curve.

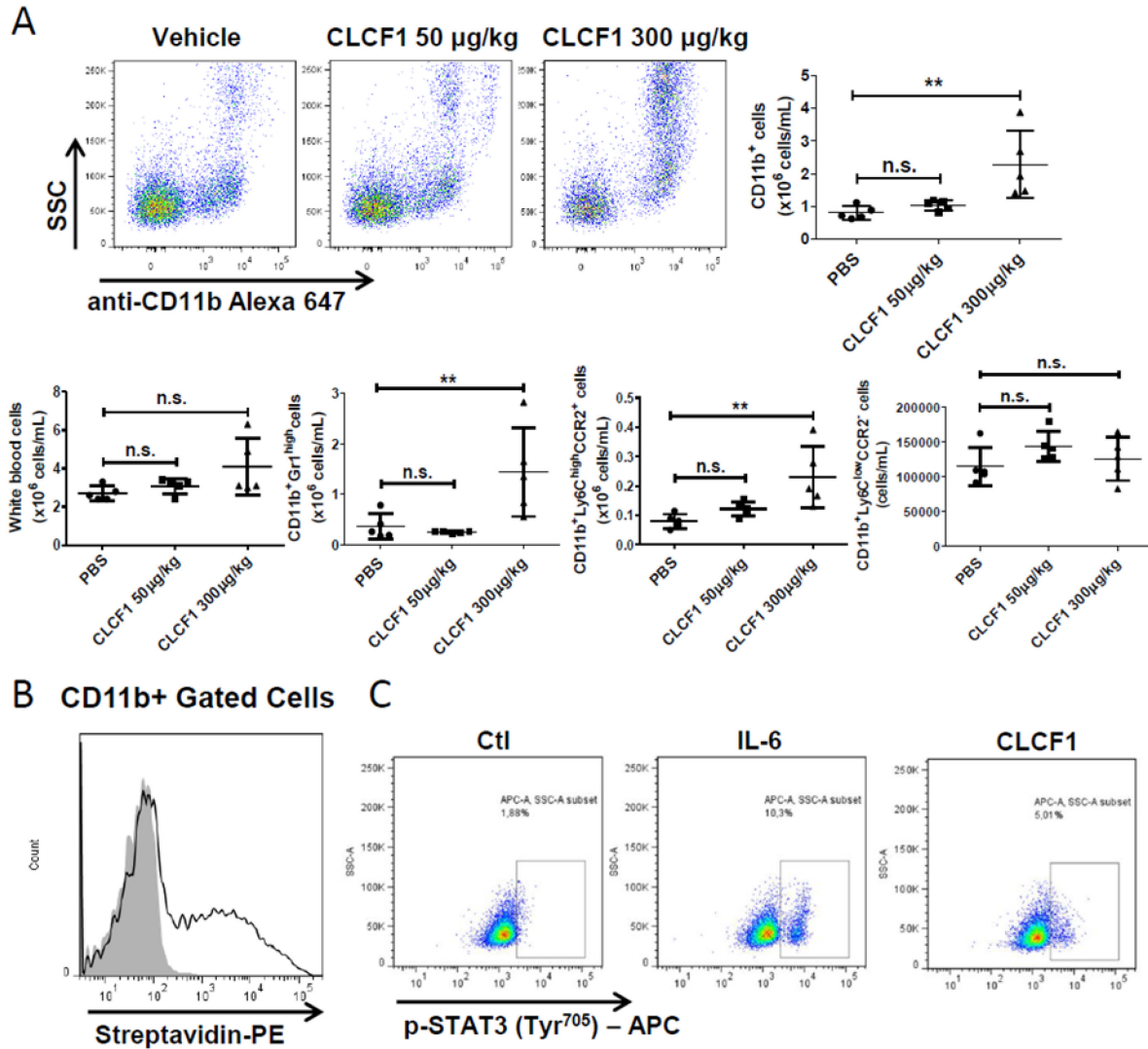
**FIGURE 4. CLCF1 promotes foam cell formation.** BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h prior to ac-LDL (100  $\mu$ g/ml)/cholesterol (5  $\mu$ M) treatment. Triglyceride accumulation by macrophages was assessed by AdipoRed staining. **(A)** Representative confocal micrographs of AdipoRed and DAPI nucleus staining are displayed for each condition. Scale bars, 5  $\mu$ m. **(B)** Total triglyceride accumulation by macrophages was quantified by AdipoRed staining using a fluorescence plate reader. Bar graphs represent mean fluorescence intensities of triplicates  $\pm$  SEM. **(C)** ac-LDL uptake by macrophages was assessed by flow cytometry using Alexa Fluor 488-labeled ac-LDL. BMDM ( $1 \times 10^6$ ) were stimulated with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) for 24 h, serum starved for 4 h, and incubated with Alexa Fluor 488-labeled ac-LDL (1  $\mu$ g/ml) for 4 h. In left panel, tinted gray histograms represent Alexa Fluor 488-labeled ac-LDL uptake of BMDM treated with vehicle. Histograms represent mean

fluorescence intensities of triplicates  $\pm$  SD. Statistical analysis was assessed using ANOVA test. \*\*\* $p < 0.001$ .

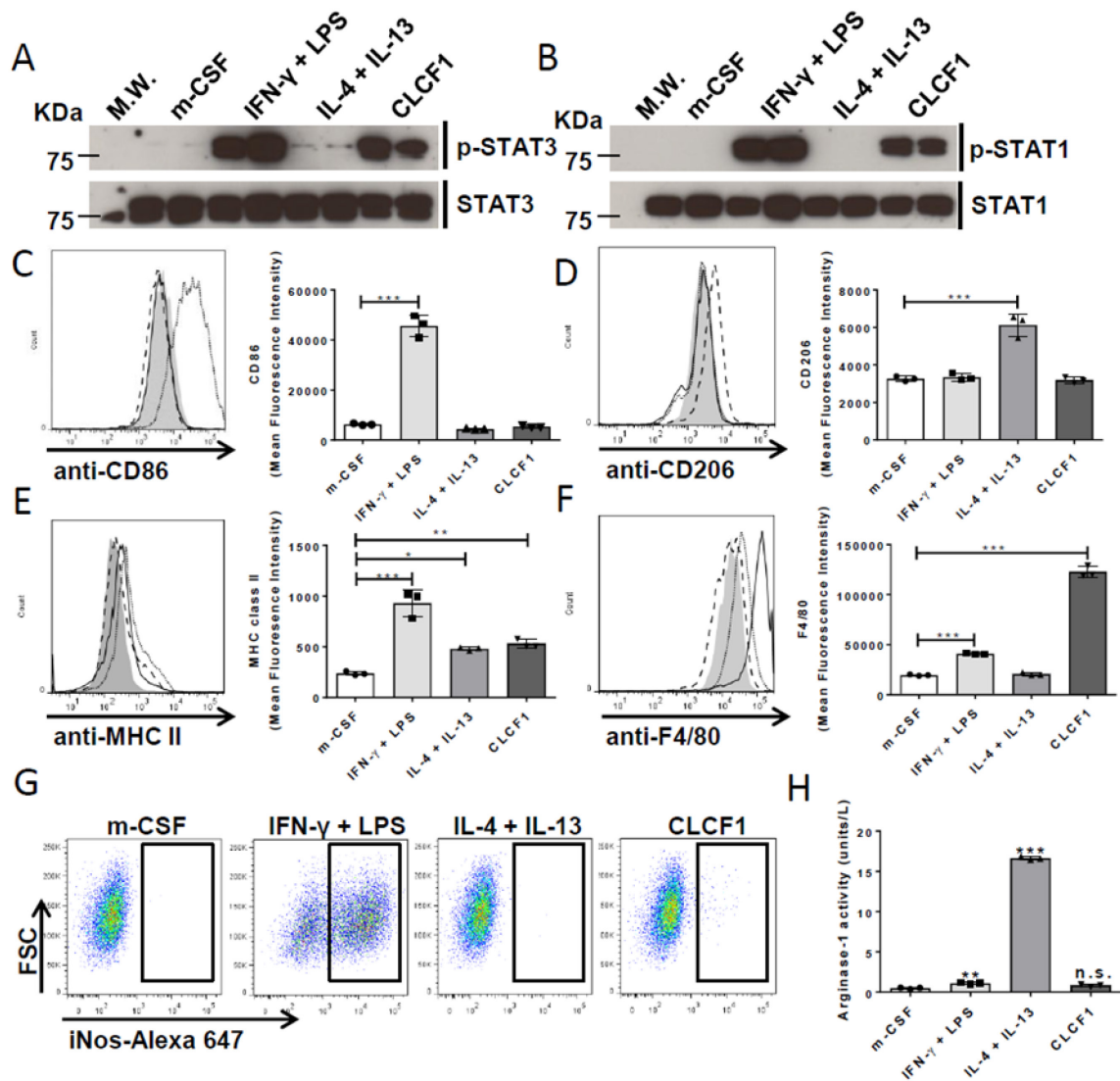
**FIGURE 5. CLCF1 induces SR-A1 upregulation.** (A) Western blot analysis of SR-A1 and CD36 were realized using cell lysates of BMDM ( $1 \times 10^6$ ) treated for 24 h with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml). Blots were probed with anti-SR-A1 mAbs, anti-CD36 mAbs, or anti-GAPDH mAbs and HRP-labeled secondary Abs. (B) BMDM ( $1 \times 10^6$ ) treated for 24 h with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) were stained with allophycocyanin-labeled anti-SR-A1 and PE-labeled anti-CD36 mAbs; fluorescence was quantified by flow cytometry. In left panels, the gray shading and black line in the histograms denote BMDM treated with vehicle or CLCF1, respectively. Statistical analysis was assessed using Student unpaired t test, \*\* $p < 0.01$ . (C) Triglyceride accumulation by BMDM in presence of neutralizing anti-SR-A1 or isotype mAbs (4  $\mu$ g/ml) was quantified by AdipoRed staining using a fluorescence plate reader. (D) ac-LDL uptake by BMDM pretreated for 24 h with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) alone or in presence of neutralizing anti-SR-A1 mAbs or isotype control (4  $\mu$ g/ml) was assessed by flow cytometry using Alexa Fluor 488-labeled ac-LDL (1  $\mu$ g/ml). In the left panel, the gray shading, dotted line, and black line in the histograms denote BMDM pretreated with vehicle, CLCF1 plus isotype control, or neutralizing anti-SR-A1, respectively. Bar graphs indicate mean fluorescence intensities of triplicates  $\pm$  SD. Statistical analysis was assessed using two-way ANOVA test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**FIGURE 6. CLCF1 induction of SR-A1 upregulation and foam cell formation is dependent on JAK/STAT activation.** (A) SR-A1 surface expression on BMDM ( $1 \times 10^6$ ) following CLCF1 stimulation in presence or absence of ruxolitinib (50  $\mu$ M) was measured by flow cytometry using allophycocyanin-labeled anti-SR-A1. In left panels, the gray shading and black line in the histograms denote unstimulated or CLCF1-stimulated BMDM, respectively. (B) Triglycerides accumulation by macrophages treated with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) alone or in presence of ruxolitinib (50  $\mu$ M) was assessed by AdipoRed staining using a fluorescence plate reader. (C) ac-LDL uptake by BMDM ( $1 \times 10^6$ ) pretreated for 24 h with vehicle or CLCF1 (100 ng/ml) in presence or absence of ruxolitinib (50  $\mu$ M) was assessed by flow cytometry using Alexa Fluor 488-labeled ac-LDL (1  $\mu$ g/ml). In left panels, the gray shading and black line in

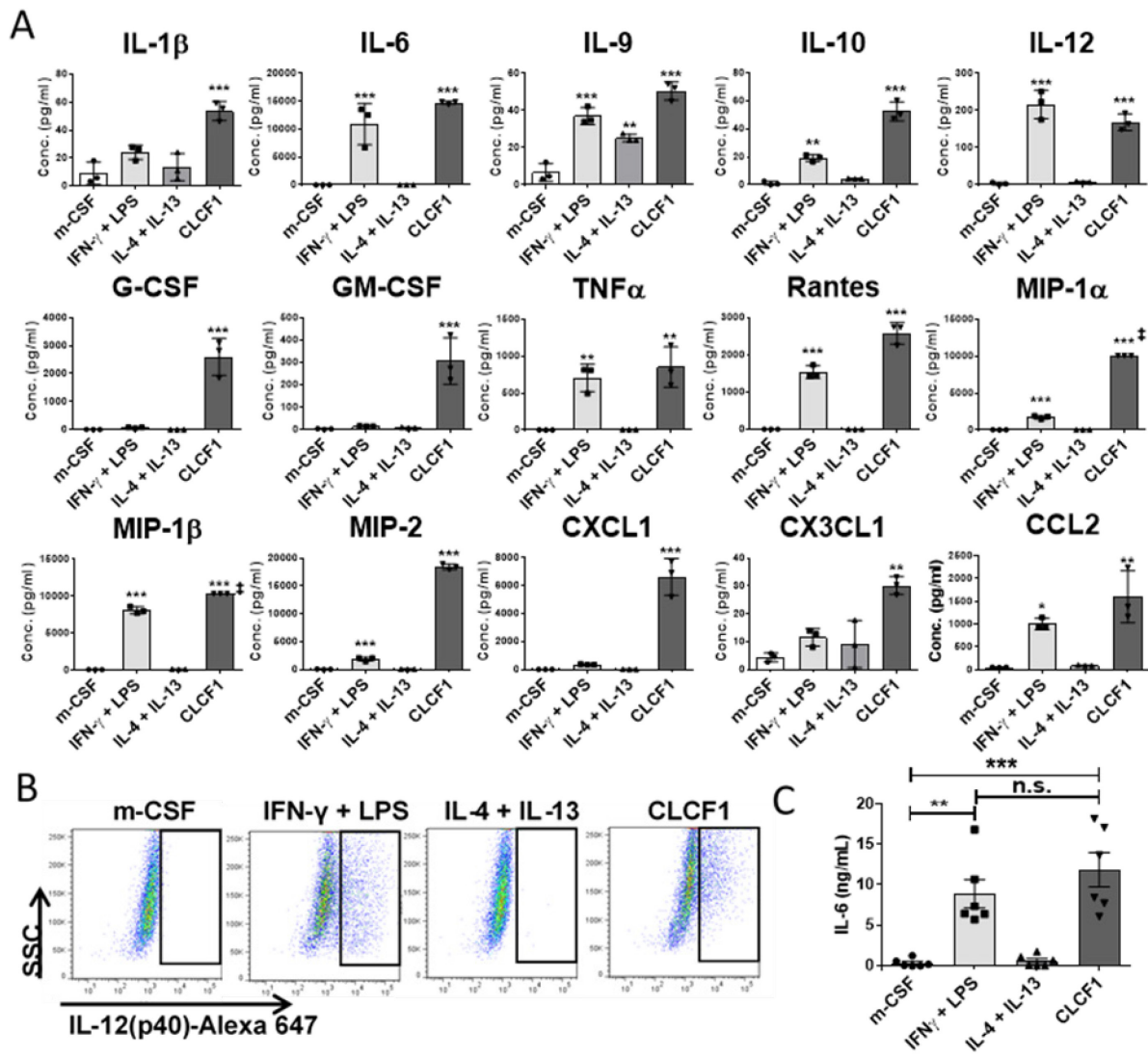
the histograms denote BMDM pretreated with vehicle or CLCF1, respectively. Bar graphs indicate mean fluorescence intensities of triplicates  $\pm$  SD. Statistical analysis was assessed using two-way ANOVA test. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**FIGURE 1. CLCF1 increases circulating myeloid cells and activates CD11b<sup>+</sup> BM cells.**

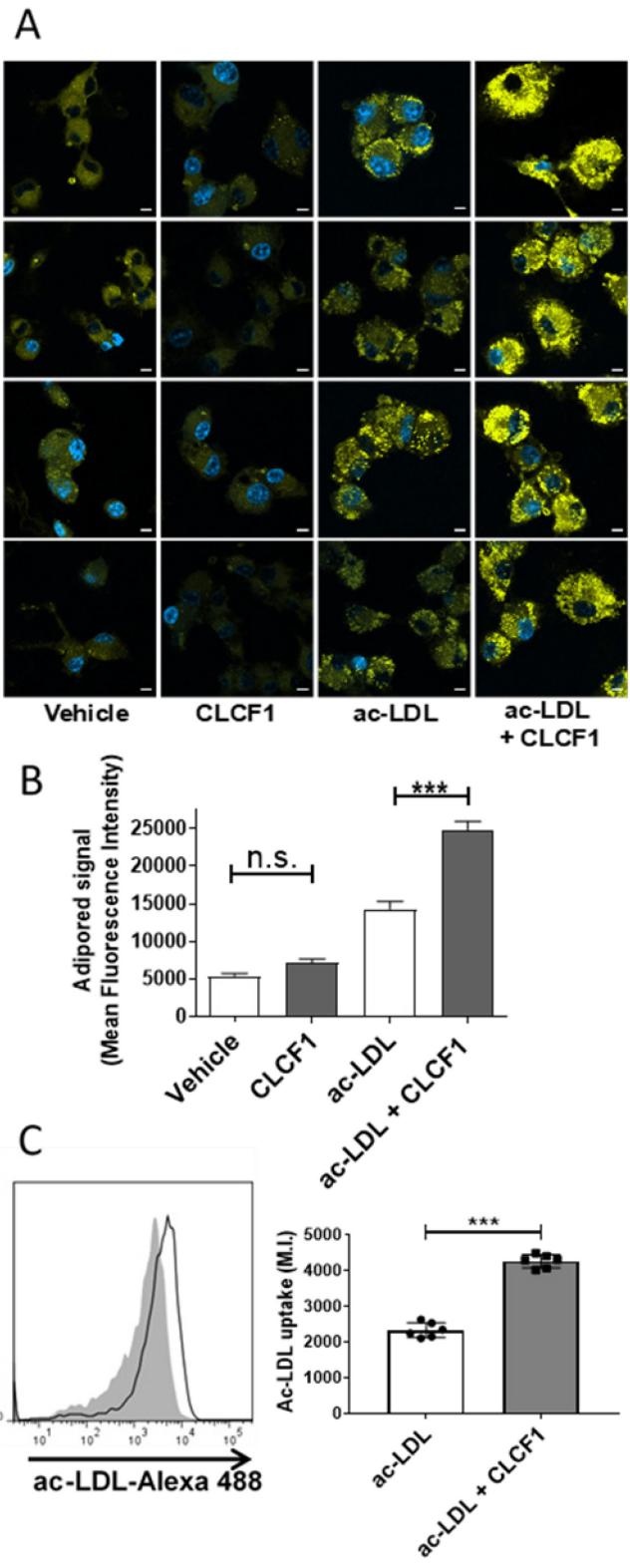


**FIGURE 2. CLCF1 activates p-STATs in BMDM without inducing a prototypic polarization phenotype**

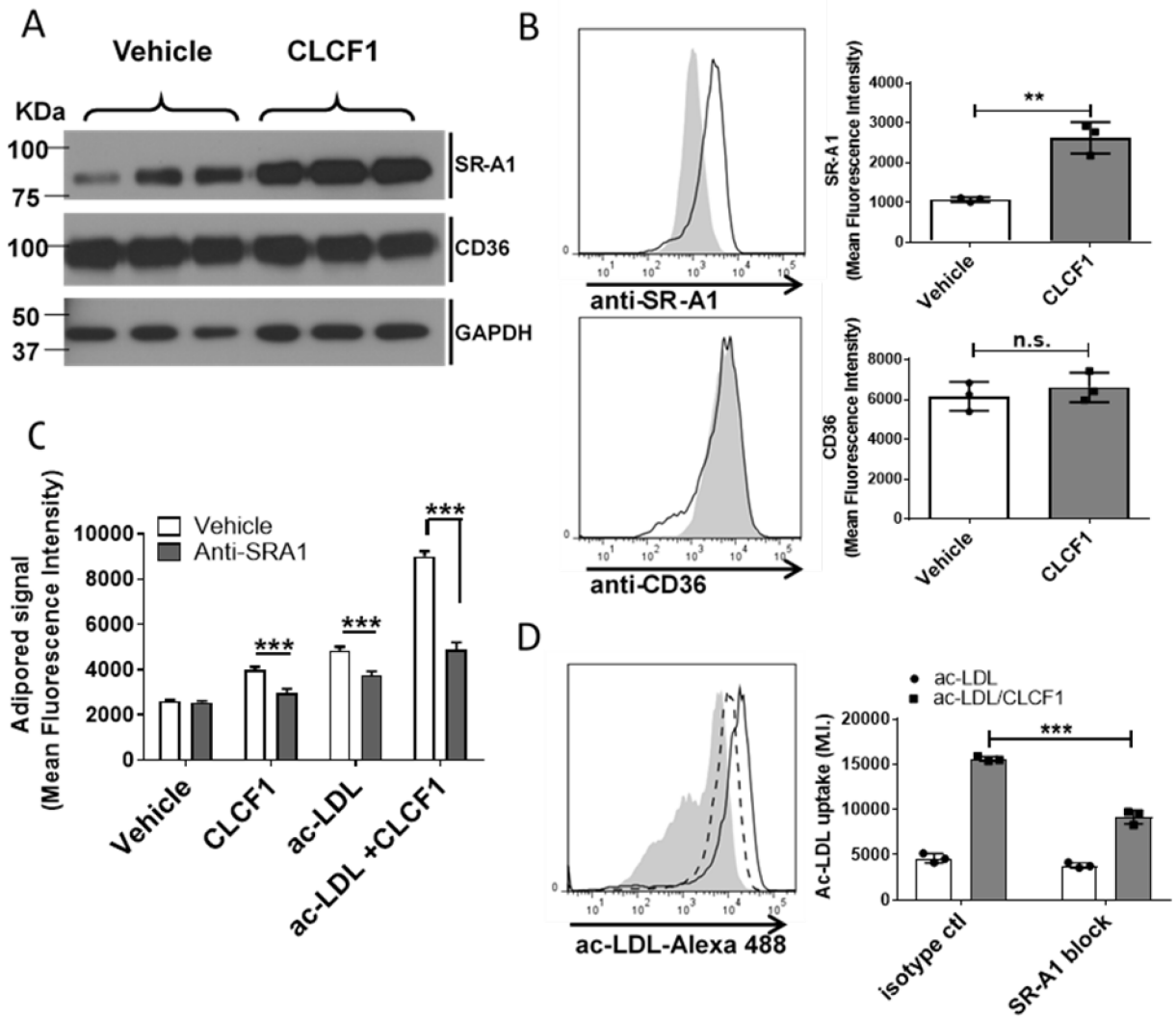


**FIGURE 3. CLCF1 induces secretion of proinflammatory cytokines and chemokines.**

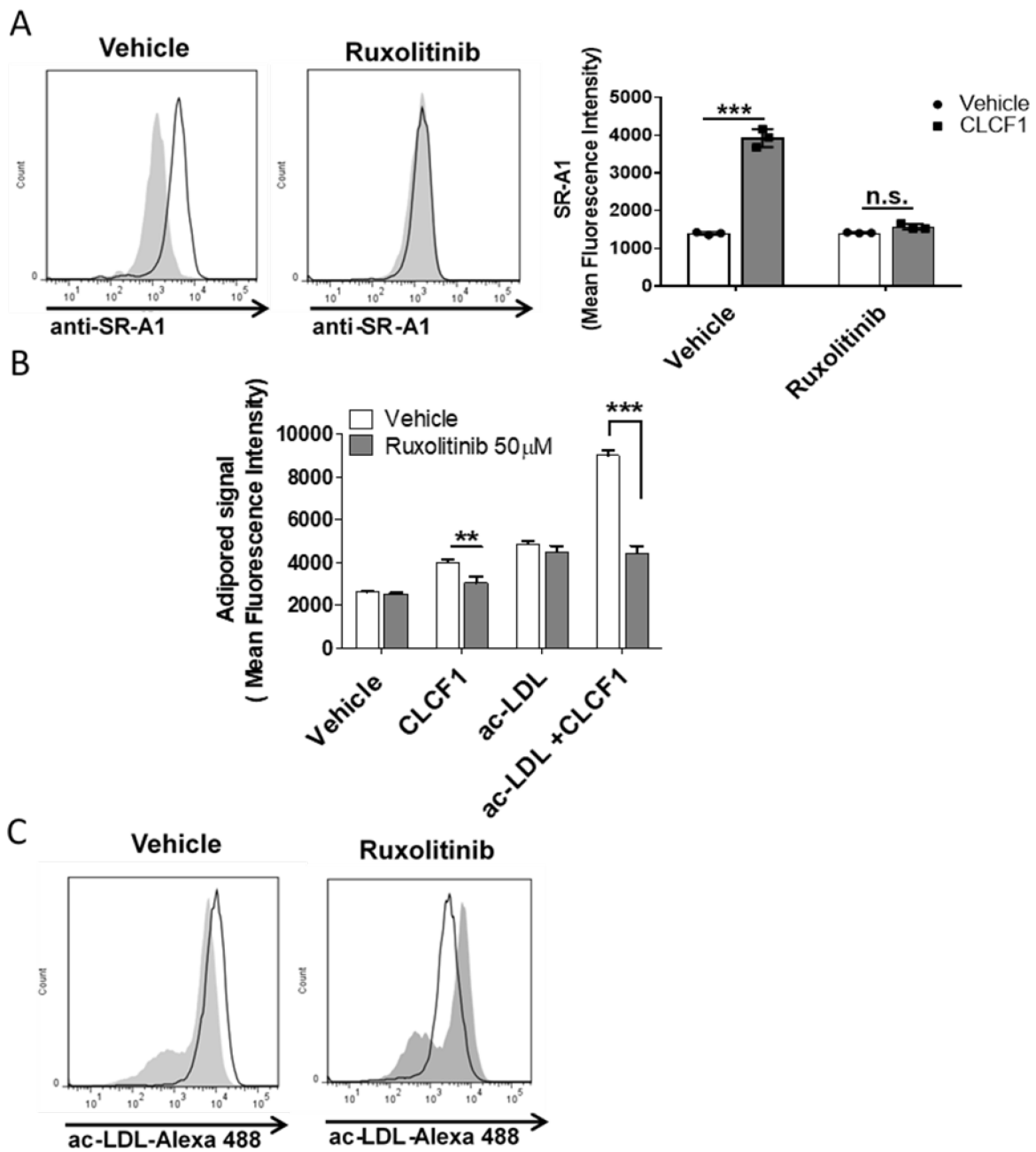




**FIGURE 4. CLCF1 promotes foam cell formation**



**FIGURE 5. CLCF1 induces SR-A1 upregulation.**



**FIGURE 6. CLCF1 induction of SR-A1 upregulation and foam cell formation is dependent on JAK/STAT activation.**



### **Article 3.**

Pasquin S, Chehboun S, Dejda A, Meliani Y, Savin V, Warner GJ, Bosse R, Tormo A, Mayer G, Sharma M, Sapielha P, Martel C, Gauchat JF. (2018). Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophinlike cytokine factor 1(CLCF1) activity. *Scientific Reports*. 8(1): 3990.

Article original publié dans *Scientific Reports*

## **Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity**

Sarah Pasquin<sup>1</sup>, Salma Chehboun<sup>1</sup>, Agnieszka Dejda<sup>2</sup>, Yasmine Meliani<sup>1</sup>, Virginia Savin<sup>3</sup>, Gregory J. Warner<sup>4</sup>, Roger Bosse<sup>4</sup>, Aurélie Tormo<sup>1</sup>, Gaétan Mayer<sup>5</sup>, Mukut Sharma<sup>3</sup>, Przemyslaw Sapieha<sup>2</sup>, Catherine Marte<sup>1,6</sup> & Jean-François Gauchat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

<sup>2</sup>Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

<sup>3</sup>Renal Division, KCV Medical Center, Kansas City, MO, 64128-2226, USA.

<sup>4</sup>Perkin Elmer, 940 Winter Street, Waltham, MA, 02451, USA.

<sup>5</sup>Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

<sup>6</sup>Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

Sarah Pasquin and Salma Chehboun contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-F.G. (email: [jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca))

Scientific Reports | (2018) 8:3990 | DOI:10.1038/s41598-018-22400-y

## Abstract

The cytokines CLCF1 and CNTF are ligands for the CNTF receptor and the apolipoprotein E (ApoE) receptor sortilin. Both share structural similarities with the N-terminal domain of ApoE, known to bind CNTF. We therefore evaluated whether ApoE or ApoE-containing lipoproteins interact with CLCF1 and regulate its activity. We observed that CLCF1 forms complexes with the three major isoforms of ApoE in co-immunoprecipitation and proximity assays. FPLC analysis of mouse and human sera mixed with CLCF1 revealed that CLCF1 co-purifies with plasma lipoproteins. Studies with sera from ApoE<sup>-/-</sup> mice indicate that ApoE is not required for CLCF1-lipoprotein interactions. VLDL- and LDL-CLCF1 binding was confirmed using proximity and ligand blots assays. CLCF1-induced STAT3 phosphorylation was significantly reduced when the cytokine was complexed with VLDL. Physiological relevance of our findings was asserted in a mouse model of oxygen-induced retinopathy, where the beneficial anti-angiogenic properties of CLCF1 were abrogated when co-administrated with VLDL, indicating, that CLCF1 binds purified lipoproteins or lipoproteins in physiological fluids such as serum and behave as a “lipocytokine”. Albeit it is clear that lipoproteins modulate CLCF1 activity, it remains to be determined whether lipoprotein binding directly contributes to its neurotrophic function and its roles in metabolic regulation.

## Introduction

Cardiotrophin-like cytokine (CLCF1) is an IL-6 family cytokine<sup>1,2</sup> efficiently secreted as a complex with the soluble cytokine receptor cytokine-like factor 1 (CRLF1)<sup>3,4</sup>. CLCF1 activates the tripartite ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR), comprised of CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$ 5. CLCF1 and CNTF share signaling pathways<sup>5,6</sup> suggesting that the extensive pre-clinical and clinical investigations conducted on CNTF might also be indicative of the therapeutic potential of CLCF1. CNTF demonstrated potent neurotrophic activities *in vitro* and in animal models of neurodegenerative diseases, leading to clinical trials in patients suffering from Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis and promising effects in retinal degeneration pathologies<sup>7-11</sup>. Systemic administration of CNTF resulted in unexpected substantial weight loss<sup>8</sup>. This observation triggered preclinical investigations of CNTF in models of metabolic syndrome. Daily CNTF injections led to long-term anorexic effects in diet-induced obese and leptin-deficient mice<sup>12,13</sup>. CNTF decreased hyperglycemia and hyperinsulinemia suggesting that it could overcome leptin resistance in obese individuals and benefit type II diabetics<sup>12,13</sup>. The effects of CNTF are believed to be both central and systemic, as CNTFR is expressed in the region of the brain controlling energy balance, in adipose tissues and in skeletal muscle<sup>12,14-16</sup>.

Thanks to these promising preclinical results, a CNTF derivative was tested in clinical trials in which significant weight loss was observed<sup>17,18</sup>, indicating that activation of the CNTFR can regulate food intake and metabolism.

The existence of a second CNTFR ligand had been predicted from, i) dramatic differences between the phenotypes of CNTFR and CNTF deficient mice<sup>19</sup>; ii) observations that CNTF is a cytoplasmic cytokine devoid of signal peptide<sup>20,21</sup>; iii) identification of a CNTF-inactivating mutation homozygous in 2-3% of the study population, without observable neuropathology<sup>22</sup>. The role of CLCF1 as a key CNTFR ligand during development is corroborated by similarities in the phenotypes of CLCF1, CRLF1 and CNTFR deficient mice<sup>19,23-25</sup> and the overlap between the syndromes associated with mutations in CLCF1, CRLF1 and LIFR $\beta$  genes<sup>4,26-28</sup>. Mutations in CRLF1 and CLCF1 genes result in Crisponi (MIM 601378) and cold-induced sweating



(CISS; MIM 272430 and 610313) syndromes, two rare overlapping recessive conditions<sup>4,26,27,29</sup>. Infants with these conditions manifest marked disinterest in food<sup>4,26,27,29</sup> suggesting CLCF1, like CNTF can regulate food intake. Crisponi syndrome patients tend to suffer from high-grade fever episodes and most die during the first year of life<sup>4,26</sup>, supporting a role of CLCF1 in the regulation of metabolism.

Kidney cells express CNTFR<sup>30</sup>. CLCF1 and CRLF1 are detectable in the developing kidney and can induce the development of mature nephron structure *in vitro*<sup>31</sup>. A urinary system anomaly has been reported in a CISS patient with a mutation in CRLF132, supporting a role of CLCF1 in kidney development. Our results<sup>33</sup> suggest an involvement of CLCF1 in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), the most common primary glomerular cause of renal disease in children and adults<sup>34</sup>. Numerous lines of evidence support the presence of a circulating factor in FSGS patient with recurrence<sup>33</sup>. We identified CLCF1 in the serum of FSGS patients and observed that CLCF1 activates the STAT3 signaling in glomeruli and podocytes and induces albuminuria in mice and proteinuria in rats<sup>33</sup>, indicating that this cytokine could represent such factor.

Normal serum comprises components that can inactivate the permeability inducing factor detected in FSGS sera. Fractionation studies of sera from healthy volunteers identified ApoE as an anti-permeability factor<sup>35</sup>. This suggests CLCF1 could interact with ApoE. In support of this hypothesis, lipoprotein apheresis, a procedure that depletes ApoE complexed with lipids<sup>36</sup>, is used as a therapeutic option for steroid-resistant FSGS<sup>37,38</sup> and CNTF was shown to interact with ApoE *in vitro*<sup>39</sup>.

Interestingly, recent studies have demonstrated an association between ApoE variants and aberrant lipid metabolism in age-related macular degeneration<sup>40-43</sup>. CNTF is a potent treatment in retinal degeneration pathologies, such as retinitis pigmentosa, underlying a possible interaction between CNTF and ApoE containing lipoproteins in the retina<sup>11,44-46</sup>.

We observed that CLCF1, like CNTF<sup>39</sup>, binds ApoE an important modulator of lipids transport and metabolism. CLCF1, when incubated with serum or purified lipoproteins, participates in

lipoprotein-lipid complexes. Formation of complexes with lipoprotein particles changes the biological activity of CLCF1 on CNTFR transfectants and CNTFR expressing cell lines and tissues. This indicates that CLCF1 is likely a “lipocytokine” in serum or cerebrospinal fluid and, that lipoprotein may regulate the neurotrophic and metabolic functions of this cytokine as well as its pathological role in FSGS.

## Results

### **CLCF1 forms complexes with ApoE2, 3 and 4.**

As an initial test to determine whether CLCF1 formed a complex with ApoE, we incubated biotinylated CLCF1 with ApoE and immunoprecipitated ApoE using an anti-CLC mAb. As reported for CNTF<sup>39</sup>, co-immunoprecipitation of CLCF1 with the three most common ApoE isoforms, ApoE2, 3 and 4 could be observed (Fig. 1A). We next analyzed whether CLCF1 and ApoE form complexes when co-expressed in transfectants. Efficient secretion of CLCF1 by fibroblasts requires co-expression of the soluble cytokine receptor CRLF1<sup>4,5</sup>. We therefore generated stable transfectants expressing ApoE2, 3 or 4, co-expressing CLCF1 and CRLF1 or co-expressing CLCF1 and CRLF1 with either ApoE2, 3 or 4. As expected, ApoE2, 3 and 4 or CLCF1 could be detected in the culture medium of the cells transfected with the corresponding cDNA (Fig. 1B lower panels). Isolation of ApoE2, 3 and 4 from the transfectants culture medium by affinity chromatography using anti-ApoE mAb resulted in co-isolation of CLCF1 (Fig. 1B upper panels). This confirmed the ApoE-CLCF1 interaction (Fig. 1A) when ApoE2, 3 or 4 was co-incubated with CLCF1 and also indicated that the formation of ApoE-CLCF1 complex was not prevented by CRLF1.

To avoid potential competition between exogenous or secreted ApoE and fetal bovine serum ApoE, these experiments were performed using buffered solutions (Fig. 1A) or serum-free cell culture medium (Fig. 1B). Serum ApoE is involved in transport of bound lipids. The formation of complexes with lipids is believed to strongly affect ApoE structure including the four helix NH2 domain that resembles type I cytokines<sup>47,48</sup>. We therefore determined whether CLCF1 could also form complexes with serum ApoE. We mixed mouse CLCF1 with serum isolated from WT or ApoE<sup>-/-</sup> mice and subjected the mixture to immunoaffinity chromatography using

anti-mouse ApoE mAb. Co-immunoprecipitation of CLCF1 and ApoE could be detected (Fig. 1C). However, similar immunoaffinity chromatography using a mixture of CLCF1 and ApoE deficient mouse serum did not result in co-immunoprecipitation thus ruling out a non-specific isolation of CLCF1 (Fig. 1C). As it is unclear whether mouse ApoE should be considered as ApoE3 or ApoE4 subtype<sup>49,50</sup>, we examined whether CLCF1 forms a complex with human serum ApoE3 (Fig. 1D). As observed with mouse serum, co-immunoprecipitation of human serum ApoE and CLCF1 was detected, indicating that formation of the CLCF1-ApoE complex could be detected in the presence of serum proteins and lipids (Fig. 1D).

### **Complexes between ApoE2, 3 and 4 and CLCF1 can be detected in solution using an AlphaLISA proximity assay.**

We next examined whether the formation of complexes could also be observed in solution using a proximity assay. In this assay biotinylated CLCF1 is used to recruit the streptavidin coated donor beads while the anti-rat IgG acceptor beads are recruited by the anti-ApoE mAb/ApoE, putative CLCF1 binding partner (Fig. 2). A strong energy transfer was detected between the donor and acceptor beads, indicating that interaction between CLCF1 and ApoE2, 3 and 4 could be detected in solution. (Fig. 2A). The observed signal was more than  $10 \times$  higher than the background energy transfer in the absence of CLCF1, ApoE or anti-ApoE mAb, indicating that it was induced by the formation of CLCF1-ApoE-anti-ApoE complexes (Fig. 2A).

### **CLCF1-ApoE complexes are not disrupted by lipids.**

Having shown that CLCF1-ApoE can be detected in solution using the AlphaLISA proximity assay (Fig. 2A), we used this approach to assess the effect of lipid-induced change in ApoE structure on the interaction between CLCF1 and ApoE. While our data on co-immunoprecipitation between serum ApoE and CLCF1 suggest that ApoE can interact with CLCF1 in the presence of lipids, the formation of complex between lipid-free ApoE and the cytokine could not be excluded. 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) is extensively used as a model lipid that binds and induces ApoE conformation changes<sup>47</sup>. We therefore investigated the effect of DMPC on CLCF1-ApoE3 interaction. Preincubation of ApoE with DMPC at concentration previously used to alter ApoE four  $\alpha$ -helix NH2 domain structure<sup>47</sup> markedly increased the proximity assay signal (Fig. 2B), indicating that lipid-bound

ApoE, which is believed to represent the bulk of extracellular ApoE, can still form a complex with CLCF1. Interestingly, the interaction between the predominant ApoE isotype, ApoE3, and CLCF1 was more sensitive to the effect of DMPC than ApoE2-CLCF1 or ApoE4-CLCF1 according to the proximity assay signal (Fig. 2B).

### **ApoE increases the biological activity of CLCF1.**

Next, we determined whether ApoE could modify CNTFR recruitment and activation using Ba/F3 transfectants expressing the tripartite CNTFR<sup>5</sup>. Interestingly, while the binding of biotinylated CLCF1 was slightly decreased in the presence of ApoE3 (Fig. 3A), CLCF1-induced STAT3 phosphorylation was increased in the presence of ApoE3 (Fig. 3B).

### **CLCF1 co-purifies/co-elutes with ApoE-containing lipoprotein complexes.**

This observation prompted us to examine whether CLCF1 participated in ApoE-containing lipoprotein complexes. We therefore subjected CLCF1 mixed with mouse or human serum to Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC). This approach is widely used to analyze lipoprotein complexes<sup>51</sup>. CLCF1 was detected in the ApoE containing fractions suggesting that the two proteins form complexes (Fig. 4A, B). No CLCF1 could be revealed in the fractions containing free proteins or small size protein complexes, indicating that CLCF1 is mainly bound to large size, presumably lipoprotein complexes. This is further supported by the data obtained when CLCF1 was mixed with sera from ApoE<sup>-/-</sup> mice. The lipoprotein elution profile is modified in these mice i.e. the proportion of VLDL, IDL and LDL is markedly increased while that of HDL is decreased<sup>52</sup>. Although the CLCF1 elution profile was altered (Fig. 4C), CLCF1 remained in lipoprotein fractions. This suggests that CLCF1 can interact with lipoprotein complexes independent of ApoE and that it represents a “lipocytokine”.

### **CLCF1 binds VLDL and LDL.**

To test whether CLCF1 can bind lipoproteins we used a ligand blotting approach used to detect LDL receptors<sup>53</sup>. CLCF1 was subjected to SDS-PAGE under non-reducing conditions, transferred to nitrocellulose and incubated with biotinylated LDL, HDL or VLDL (Fig. 5A). A clear signal was detected when CLCF1 monomers and multimers were incubated with VLDL and LDL while no signal could be observed with BSA, used as a specificity control or when

CLCF1 was incubated only with the reagent used to detect biotinylated lipoproteins (Fig. 5A left panel). A very faint signal was observed with HDL.

To confirm CLCF1-lipoprotein interactions, we performed AlphaLISA proximity assays between biotinylated CLCF1 (to recruit streptavidin coated donor beads) and VLDL, LDL or HDL covalently conjugated to acceptor beads. Strong fluorescent signals were obtained when CLCF1 was mixed with LDL and VLDL (Fig. 5B). As observed with the ligand blot assays, no clear positive signals were detected when the proximity assay was performed using HDL-conjugated beads (Fig. 5B). To assess the specificity of the signal, we carried out competition experiments by adding increasing amount of unlabeled CLCF1 to protein-protein interactions assays. As expected, the presence of unlabeled CLCF1 decreased biotinylated CLCF1-LDL and CLCF1-VLDL proximity assay signal indicating that the latter was specific (Supplementary Figure S1). No competition was observed for the very low CLCF1-HDL signal suggesting that it was nonspecific. These results indicate that CLCF1 can efficiently participate to form complexes with LDL and VLDL lipoproteins.

#### **Lipoproteins modify CLCF1 binding to CNTFR-expressing transfectants and cell lines.**

Next, we investigated whether the formation of CLCF1-lipoprotein complex influences the binding of CLCF1 to Ba/ F3 transfectants expressing the tripartite CNTFR (CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$ ). When Ba/F3 cells were incubated with biotinylated CLCF1 in the presence of HDL or LDL, the binding of the cytokine was not significantly modified (Fig. 6A). Inclusion of VLDL markedly enhanced CLCF1 binding to the CNTFR transfectants (Fig. 6A). To exclude possibility that the VLDL-effect is linked to a characteristic of the Ba/F3 pro-B cell line, we investigated the effect of the lipoproteins on the binding of CLCF1 to IMR-32 human neuroblastoma cells or the 3T3-L1 mouse pre-adipocytes both expressing CNTFR<sup>5,14</sup>. As observed with the Ba/F3 CNTFR, the presence of VLDL strongly increases the binding to the CNTFR expressing cells (Fig. 6B and C). No CLCF1 binding could be detected on Ba/F3 expressing LIFR $\beta$  in the presence or absence of lipoproteins (data not shown).

### **CLCF1 activity is modified by HDL, LDL and VLDL.**

We next used CNTFR expressing Ba/F3 transfectants to evaluate whether binding to lipoprotein would modify the activity of CLCF1. We analyzed the activation of the CNTFR signaling pathways by phospho-specific flow cytometry<sup>54</sup>. CLCF1 did not induce a significant change of STAT3 phosphorylation in Ba/F3 cells when HDL or LDL concentration in the medium was close to serum levels<sup>55</sup> (Fig. 7A). Inclusion of VLDL sharply reduced CLCF1-induced signaling (Fig. 7A). Time-course experiments indicated that the signaling reduction observed at 15 min in the presence of VLDL was not due to a delay in STAT3 activation (Fig. 7C).

In preclinical mouse models of retinopathy, activation of the JAK-STAT3 pathway by the CNTFR ligand CNTF was shown to be therapeutically beneficial in blocking pathological neovascularization and led to CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implant as an established treatment for retinitis pigmentosa and macular telangiectasia<sup>11,44-46</sup>. We therefore tested the capacity of VLDL to inhibit CLCF1-induced STAT3 phosphorylation in ARPE-19 retinal epithelial cell line cultures. As observed with Ba/F3 transfectants, inclusion of VLDL markedly attenuated the CLCF1-induced phosphorylation of STAT3 (Fig. 7B). Altogether, our results indicate that VLDL, while increasing CLCF1 binding to its receptor, decreased the capacity of the CLCF1 receptor complexes to activate the JAK-STAT3 signaling pathway. Our results indicate that lipoproteins bind and regulate CLCF1 activity, suggesting that variation of the ratio between the different lipoproteins in serum or other body fluids could control the neurotrophic, metabolic and immunoregulatory functions of CLCF1.

### **CLCF1 in oxygen induced retinopathy.**

In order to investigate the relevance of our findings *in vivo*, we interrogated on the ability of CLCF1 to inhibit angiogenesis in a mouse model of oxygen induced retinopathy that is widely used to study pathological neovascularization in the retina<sup>56</sup>. Mouse pups are placed in 75% O<sub>2</sub> from postnatal day 7 to 12 to induce vascular degeneration and then returned to room air for 5 days. This model mimics retinopathy of prematurity and serves as a proxy for the angiogenic phase of proliferative diabetic retinopathy<sup>57</sup>. Intraocular injection of CLCF1 or VLDL individually significantly augmented vascular regeneration (Fig. 8A and C) and reduced pathological pre-retinal neovascularization (Fig. 8B and D) as determined at postnatal day 17.

These findings are similar to those recently reported by Bucher and colleagues for CNTF alone<sup>58</sup>. Interestingly, injections of the CLCF1-VLDL complex did not result in additive beneficial effect compared with VLDL alone suggesting that VLDL prevents the effect of CLCF1 and, that the biological activity of CLCF1 can be regulated by lipoproteins *in vivo* (Fig. 8).

## **Discussion**

CLCF1 is a potent neurotrophic factor with the ability to activate the tripartite CNTFR. Symptoms associated with mutations in the genes coding for CLCF1 or its binding partner CRLF1 suggest that this cytokine could regulate metabolism and food intake. In this study we observed that CLCF1, alike CNTF, forms complexes with ApoE, an important regulator of lipids transport and lipid metabolism. These complexes could be detected when the two binding partners were mixed or co-expressed using mouse or human proteins. CLCF1 also formed complexes with the three most common ApoE isotypes (ApoE2, 3 and 4). The formation of ApoE complexes was not prevented by co-expression with the soluble cytokine receptor CRLF1 that is necessary for efficient secretion of CLCF1 and recently shown to participate in CNTFR activation<sup>59,60</sup>. CLCF1-ApoE complexes could be observed using complementary approaches based on unrelated principles: co-immunoprecipitation, chromatography or proximity assays. The formation of ApoE-CLCF1 complexes was increased in presence of DMPC, a compound known to bind ApoE and previously used to investigate the lipid-induced changes of ApoE conformation<sup>47</sup>. This together with the observation that CLCF1 interacts with ApoE in lipid-containing serum indicates that CLCF1 is likely to bind ApoE in circulation. CLCF1-ApoE complexes could also be present in the central nervous system where ApoE plays a key role in lipid transport and regulation of neural function. CLCF1 has neuroprotective role during development in mouse models<sup>24</sup>. Interestingly, considering the high physiological concentration of ApoE in serum and cerebrospinal fluids, CLCF1 is expected to play its exocrine functions in an ApoE-complexed form.

In support of this notion, no CLCF1 could be detected in the small protein fraction of mouse and human serum. While ApoE binds CLCF1, fractionation of ApoE-deficient mouse sera mixed with this cytokine indicates that ApoE is not required for the interaction of CLCF1 with

lipoproteins. Further analysis revealed that CLCF1 binds with different plasma lipoproteins (LDL and VLDL). Thus, these results provide a strong rationale to consider CLCF1 as a “lipocytokine” and to pursue the investigation of its functions and pharmacology in lipid-complexed forms.

In line with its capacity to bind lipoprotein, CLCF1 has been shown to bind with high affinity to two lipoprotein receptors, sortilin and the sortilin-related multi-ligand receptor sorLA<sup>59,60</sup>. It will be of interest to evaluate whether CLCF1-lipoprotein complexes mediate specific functions through these receptors and whether lipoproteins modify CLCF1 pharmacology by targeting the cytokine to cells expressing sortilin, sorLA or other lipoprotein receptors.

CLCF1 is a regulator of kidney development, of glomerular function and is believed to be a permeability factor implicated in the development and recurrence of the progressive renal disease FSGS<sup>33</sup>. Interestingly, depletion of lipoproteins by plasmapheresis is successfully used in treating FSGS and preventing kidney graft loss<sup>59,60</sup>. Therefore, we suggest, that CLCF1 could be the critical factor that is removed from the patients’ circulation during plasmapheresis. Future investigation on the regulatory role of ApoE and lipoproteins on the glomerular effect of CLCF1 might open new therapeutic approaches to treat FSGS.

We investigated the effect of ApoE and lipoproteins on CLCF1 biological activity through CNTFR. These experiments were significantly complicated by the fact that most biological assays are carried out in the presence of serum that contain lipoproteins. We found that addition of lipoproteins in proliferation assays strongly modified the background response even when we used delipidated serum or serum-free media, and prevented interpretation of the results (data not shown). Therefore, our experiments focused on signalling assays that could be performed in serum-free solutions and condition in which lipoprotein alone had no effect on the signalling cascade investigated. Data obtained regarding STAT3 phosphorylation, a key CNTFR signalling molecule activated by CLCF1<sup>5,6</sup> indicate a significant modulation of the biological activity of CLCF1 by lipoproteins. Similar results were obtained with CNTFR transfectants and cell lines constitutively expressing CNTFR. Intriguingly, HDL-CLCF1 and LDL-CLCF1 complexes induced a slight but not significant increase of STAT3 phosphorylation *in vitro*



compared to CLCF1 alone. The most striking effects were observed with VLDL: addition of this type of lipoprotein strongly reduced the induction of STAT3 phosphorylation by CLCF1. As VLDL did not inhibit CLCF1-CNTFR binding, this suggests that the binding of CLCF1 on VLDL interferes with the recruitment or the heterodimerization of the signaling chain LIFR $\beta$  and gp130. This prompted us to study the effect of VLDL in an *in vivo* assay in which activation of the CNTFR might be relevant for preclinical studies. Intraocular injection of either VLDL or CLCF1 in a mouse model of oxygen-induced retinopathy showed a beneficial effect on both retinal neovascularization and vaso-obliteration. No differences could be detected between VLDL alone and CLCF1 plus VLDL suggesting that the effect of CLCF1 is prevented by VLDL *per se*. Altogether, these results suggest that the cholesterolemic profile, (i.e. the concentration and the ratio between the different lipoproteins) could directly influence the biological activities of CLCF1 in functions such as neuron survival, immune response and metabolism. It would be of interest to investigate whether a disruption or an imbalance of CLCF1 activity regulation by lipoproteins could contribute to the deleterious effects observed in FSGS patients and whether recombinant ApoE or synthetic lipoprotein complexes could be beneficial in this pathology.

While our study focused on CLCF1, this cytokine shares biological activities and biochemical properties with other cytokines that may also interact with lipoproteins. Our results provide novel insight on lipoproteins and type 1 cytokine interactions and suggest that apolipoprotein- or lipoprotein-cytokine complexes could be used to modify the therapeutic properties of recombinant cytokines.

## **Methods**

### **Production and purification of recombinant CLCF1.**

Mouse or human codon optimized synthetic cDNA (GeneArt, Thermo Fisher Scientific Inc, Burlington, ON) coding for mature CLCF1 tagged with 6 his and a biotinylated Avitag<sup>61</sup> or 6 his and a Flag (YKDDDDK) epitope were cloned in the expression vector pET24d (Novagen, Millipore Canada Ltd, Etobicoke, ON). The constructs were co-transformed with the BirA biotin-ligase coding vector pBirAcm (Avidity, Aurora, CO) in BL21 (DE3) (ThermoFisher Scientific). Expression was induced as described previously<sup>62</sup> in THY medium supplemented with 12 mg/L biotin, 50  $\mu$ g/ml kanamycin and 12.5  $\mu$ g/ml chloramphenicol. Proteins were

purified from the bacterial inclusion bodies by immobilized metal affinity chromatography<sup>63</sup>. Purifications were performed according to the instructions of the manufacturer (Qiagen Inc, Toronto, ON) using LPS free reagents and detoxified glassware. The recombinant proteins were renatured by dialysis against decreasing concentrations of urea, 100 mM glycine pH 3.5, 1 mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidized glutathione followed by 1 mM reduced glutathione, 0.1 mM oxidized glutathione in 4 mM HCl and lastly 4 mM HCl. Purified cytokine was detoxified using polymyxin B-agarose (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) to endotoxin levels below 0.1 EU/ $\mu$ g protein, assessed using a Limulus endotoxin assay (Pierce, ThermoFisher Scientific). Biological activity was measured using Ba/F3 transfected with the cDNA coding for mouse or human gp130, LIFR $\beta$  and CNTFR $\alpha$  and a Alamar Blue proliferation assay<sup>64</sup>.

#### **Generation of transfectants co-expressing CLCF1 and ApoE.**

Synthetic cDNA coding for hCLCF1/ hCLRF1, ApoE2, 3 and 4 or the combinations of hCLCF1/hCLRF1 modified by the insertion of sequences coding for T2A “self-cleaving peptides”<sup>65</sup> and the three ApoE isoforms were generated using synthetic cDNA (GeneArt) and standard molecular biology methods<sup>66</sup>. The mono or multicistronic cDNA were inserted in the expression vector pcDNA 5/FRT vector and stable Flp-In HEK293 cells transfectants generated and maintained according the Flp-In<sup>TM</sup> instruction manual (ThermoFisher Scientific).

#### **Analysis of CLCF1/ApoE interaction by co-immunoprecipitation.**

For co-immunoprecipitation assays between recombinant proteins, CLCF1 (200 ng) and ApoE 2, 3 or 4 (250 ng; BioVision, Cedarlane, Burlington, ON) were incubated alone or in combination for 16 h in 1 ml Opti-MEM<sup>TM</sup> (Life Technologies). CLCF1 was immunoprecipitated with 1  $\mu$ g anti-CLCF1 mAb (R&D systems, Cedarlane, Burlington, ON) and 30  $\mu$ l protein G agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, TX). Co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western Blotting (WB) using anti-CLCF1 or anti-ApoE mAbs (R&D systems, Cedarlane) and horseradish peroxidase (HRP)-labelled secondary Abs.

To analyze CLCF1-ApoE interaction in culture medium from Flp-In HEK-293 transfectants, cells stably transfected with pcDNA5 containing synthetic cDNAs coding for CLCF1/CRLF1, ApoE isotypes, combinations of these proteins or empty pcDNA 5/FRT were expanded to near

confluence in DMEM supplemented with fetal calf serum (FCS) and then maintained for 5 days in Opti-MEM medium. Culture medium was concentrated 20 × by ultrafiltration centrifugation and analyzed for CLCF1 or ApoE by WB as described above. One ml concentrated culture medium aliquots were incubated with 1 µg rat anti-ApoE mAb (R&D systems) and 50 µl anti-rat Ig agarose resin (Sigma-Aldrich). Resin was washed with PBS and elution induced with 70 µl of 100 µM glycine pH 2.5 (glycine buffer). Neutralized eluates were analyzed by WB.

To investigate whether CLCF1 can form a complex with mouse serum ApoE, 30 µl aliquots of WT or ApoE<sup>-/-</sup> mouse serum diluted 1:20 with PBS were incubated with or without 0.3 µg biotinylated mouse CLCF1 and 2.5 µg rabbit anti-mouse ApoE IgG for 16 h at 4 °C. Complexes were immunoprecipitated by adding 50 µl anti-rabbit Ig TrueBlot beads (Rockland Immunochemicals Inc, Limerick, PA). Beads were washed with 10 vol. PBS and retained proteins eluted with glycine buffer. Eluates were analyzed by WB using HRP-streptavidin (GE-Healthcare Life Science, Cedarlane, Burlington, ON) or rabbit anti-mouse ApoE Ab (Abcam Inc, Cedarlane) followed by HRP-labelled TrueBlot anti-rabbit Ab (Rockland Immunochemicals Inc).

To assess whether CLCF1 can form a complex with human serum ApoE, 50 µl aliquots human serum diluted 1:20 with PBS were incubated with or without 0.5 µg biotinylated CLCF1 and 2.5 µg rat-anti ApoE IgG for 16 h at 4 °C. Complexes immunoprecipitated by adding 50 µl anti-rat Ig agarose resin were washed with 10 vol. PBS. Glycine buffer eluates were analyzed by WB using HRP-streptavidin or rat-anti-ApoE and HRP-labelled anti-rat Ig.

#### **Analysis of ApoE/CLCF1 complexes by fast protein liquid chromatography (FPLC).**

Aliquots of human, WT mouse or ApoE<sup>-/-</sup> mouse serum (50 µl) were mixed with 1 µg biotinylated human or mouse CLCF1 and fractionated by FPLC using on Superose 6 HR 10/30 column at the Lipid and Lipid Metabolite Analysis Core Facility (University of Alberta, Edmonton, AB). The 40 FPLC fractions were analyzed for ApoE by WB using anti-mouse ApoE IgG as described above or biotinylated anti-human ApoE IgG (Abcam Inc) and HRP-labelled streptavidin. CLCF1 was detected using HRP-labelled streptavidin.

### **Analysis of ApoE-CLCF1 interaction by AlphaLISA.**

AlphaLISA protein-protein interaction assay was developed to evaluate CLCF1-ApoE interaction using streptavidin coated donor beads and anti-rat IgG acceptor beads (Perkin Elmer, Woodbridge, ON). ApoE2, 3 or 4 (0–100 nM) were mixed with CLCF1 (10 nM) in PBS 0.1% BSA for 1 h with rat IgG anti-ApoE (3 nM) (R&D systems, Cedarlane) and anti-rat IgG acceptor beads (10 µg/ mL). Streptavidin donor beads (40 µg/mL) were further added for 1 h protected from light. Fluorescence was quantified using an Envision multilabel plate reader (Perkin Elmer). The signal without rat IgG anti-ApoE (background) was subtracted from the data.

The effect of lipid on CLCF1-ApoE interaction was assessed by AlphaLISA protein-protein interaction assay in presence of 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) (0–1000 µM). ApoE2, 3, 4 (at 30 nM) were pre-incubated with increasing concentrations of DMPC for 1 h at 37 °C. ApoE-DMPC mix were further incubated with CLCF1 (at 10 nM) in PBS 0.1% BSA with rat IgG anti-ApoE (3 nM) and anti-rat IgG acceptor beads (10 µg/mL). Subsequently, streptavidin donor beads (40 µg/mL) were added and incubated for 1 h protected from light. Fluorescence was quantified as described above.

### **Lipoprotein biotinylation.**

Lipoproteins (HDL, VLDL, LDL, 500 µg aliquots; Alpha Aesar, Ward Hill, MA) were biotinylated using a Sulfo-NHS-Biotin Kit (Pierce, ThermoFisher Scientific) for 1 h at 37 °C. Biotinylated lipoproteins were separated from free biotin by gel filtration on Sephacryl S-100 (GE Healthcare). Biotinylation was assessed by WB. Lipoproteins were diluted in 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mM NaCl, 50 mg/ml BSA to a final concentration of 50 µg/ml for ligand blot experiments.

### **Ligand Blot experiments with biotinylated lipoproteins and immobilized CLCF1.**

Aliquots of recombinant human CLCF1 (100-200 ng) were subjected to SDS-PAGE and electro-transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked in 50 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 90 mM NaCl, 50 µg/ml BSA and incubated with biotinylated lipoproteins at 50 µg/ml for 1 h. Membrane-bound lipoproteins were revealed using HRP-

labelled neutravidin (ThermoFisher Scientific). One  $\mu\text{g}$  aliquots of LDLR, VLDLR, and SR-B1 (all from Alpha Aesar) were used as positive controls.

### **Analysis of lipoproteins-CLCF1 interaction by AlphaLISA.**

Lipoproteins-CLCF1 interactions were assessed by AlphaLISA proximity assay using streptavidin-coated donor beads and lipoproteins-conjugated AlphaLISA acceptor beads. For lipoproteins conjugations on acceptor beads, 500  $\mu\text{g}$  of unconjugated acceptor beads (Perkin Elmer) were washed in PBS and centrifuged at 16 000 g for 15 min. The conjugation was performed by mixing the acceptor beads with 50  $\mu\text{g}$  of LDL, HDL or VLDL in 200  $\mu\text{l}$  of 130 mM phosphate buffer pH 8.0 containing 20 mM of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . Beads were incubated for 18 h at 37 °C, washed twice in 200  $\mu\text{l}$  of 100 mM Tris-HCl pH 8.0 and stored at 5 mg/ml in 100 mM Tris-HCl 0,01% sodium azide.

For the interaction assays, biotinylated CLCF1 (10 nM) was mixed in PBS 0.1% BSA for 1 h with LDL, HDL or VLDL-conjugated acceptor beads (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Streptavidin donor beads (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were further added for 1 h protected from light. Fluorescence was quantified using an Envision multilabel plate reader. The signal without CLCF1 (background) was subtracted from the data. The specificity of the signal was assessed by including increasing concentrations of unlabeled CLCF1 (0–1000 nM) in the interaction assay.

### **Quantification of CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation.**

CLCF1 (100 ng/ml) was preincubated for 1 h at 37 °C with ApoE2, 3 or 4 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or purified HDL, LDL and VLDL (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Alpha Aesar). Ba/F3 transfectants cells were starved for 4 h and stimulated for 15 min at 37 °C with CLCF1, ApoE (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), purified lipoprotein complexes (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or combinations of these reagents in PBS. ARPE-19 retinal pigmented epithelial cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were starved for 24 h, detached and stimulated for 5 min at 37 °C with CLCF1, purified lipoprotein complexes (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or combinations of these reagents in PBS. For Western blot analysis, lysates of Ba/F3 transfectants were subjected to SDS-PAGE on 7.5% polyacrylamide gels and protein were electro-transferred to PVDF membranes. Total and phospho-STAT3 (Tyr 705) were detected using specific rabbit IgG (Cell signaling Technologies, Danvers, MA) and HRP-labelled anti-

rabbit antibodies (R&D systems, Cedarlane). For flow cytometry experiments, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-phospho STAT3 Abs (from BD Biosciences, Mississauga, ON or eBioscience, Affimetrix, Cedarlane) as described previously<sup>64,67</sup>. Fluorescence was quantified with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences).

#### **CLCF1-CNTFR binding assays.**

CLCF1 (1 µg/ml) was preincubated for 1 h at 37 °C with ApoE2, 3 or 4 (10 µg/ml) or purified HDL, LDL and VLDL (100 µg/ml). Ba/F3 transfectants, IMR32 neuroblastoma cells, or 3T3-L1 fibroblasts were incubated for 1 h on ice in PBS 0.1% BSA alone or supplemented with biotinylated CLCF1 (1 µg/ml), ApoE (10 µg/ml), lipoproteins complexes (100 µg/ml) or combinations of these reagents. CLCF1 binding was revealed using PE-labelled streptavidin (1 µg/ml) and flow cytometry<sup>68</sup>.

#### **Oxygen Induced Retinopathy.**

All procedures conformed to the Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the Animal Ethics Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre. C57BL/6 mice were purchased from The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Mouse pups and their fostering mothers (CD1, Charles River) were exposed to 75% O<sub>2</sub> from P7 to P12 and returned to room air<sup>57</sup>. This model serves as a proxy to human ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy, which is characterized by a late phase of destructive pathological angiogenesis<sup>69,70</sup>. Mice were injected intraocularly at P12 with CLCF1 (final intraocular concentration: 100 ng/mL), VLDL (10 µg/mL) or a combination of both. The retinas were dissected at P17, flatten mounted and incubated overnight with fluoresceinated isolectin B4 (1:100) in 1 mM CaCl<sub>2</sub> to determine extent of avascular area or neovascularization area using ImageJ and the SWIFT-neovascularization method<sup>71</sup>.

#### **Acknowledgements**

We are very grateful to Prof. Dr. Jürgen Scheller (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Germany) for the kind gift of hCNTFR-expressing Ba/F3 cells. We thank the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) genomic platform for the DNA sequencing as well as Dr. Sebastien Guiral and Dr. Jean Duchaine from

the IRIC HTS core facility for the AlphaLISA signal measurements. We are grateful to Mr. Audric Moses (Lipid and Lipid Metabolite Analysis Core Facility, University of Alberta) for the FPLC fractionations. This work was supported by The Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grant MOP-57832 to J.F.G. S.P. was supported by a fellowship from the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship-Masters (CIHR), and a doctoral scholarship from the Fond de Recherche Santé Québec (FRQS).

### **Author Contributions**

S.P. designed and performed AlphaLISA experiments, proliferations, binding and STAT3 phosphorylation assays, analyzed data and wrote the paper. S.C. designed and performed co-immunoprecipitation assays, the ligand blotting experiments and the WB assays on the FPLC-fractionated serum. A.D. and P.S. designed and performed all intraocular injections in mice model of retinopathy and generated and analyzed the corresponding data. Y.M. and A.T. did the preliminary experiments for the CLCF1-ApoE co-immunoprecipitations. G.W. and R.B. helped design AlphaLISA experiments. J.F.G. conceived and supervised the project, analyzed data and wrote the paper. C.M., G.M., V.S. and M.S. contributed to the conception of the study, the analysis of the data and the revision of the manuscript.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

## References

1. Shi, Y. et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neurotrophic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 132–138, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1181> (1999).
2. Senaldi, G. et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 11458–11463 (1999).
3. Elson, G. C. et al. Cytokine-like factor-1, a novel soluble protein, shares homology with members of the cytokine type I receptor family. *J Immunol* 161, 1371–1379 (1998).
4. Herholz, J. et al. Differential secretion of the mutated protein is a major component affecting phenotypic severity in CRLF1- associated disorders. *Eur J Hum Genet* 19, 525–533, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.253> (2011).
5. Elson, G. C. et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3, 867–872, <https://doi.org/10.1038/78765> (2000).
6. Lelievre, E. et al. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem* 276, 22476–22484, <https://doi.org/10.1074/jbc.M101681200> (2001).
7. Bloch, J. et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington’s disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15, 968–975, <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.968> (2004).
8. Miller, R. G. et al. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 1329–1331 (1996).
9. Miller, R. G. et al. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 39, 256–260, <https://doi.org/10.1002/ana.410390215> (1996).
10. Aebischer, P. et al. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2, 696–699 (1996).
11. Zhang, K. et al. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 6241–6245, <https://doi.org/10.1073/pnas.1018987108> (2011).



12. Gloaguen, I. et al. Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 6456–6461 (1997).
13. Lambert, P. D. et al. Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 4652–4657, <https://doi.org/10.1073/pnas.061034298> (2001).
14. Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W. C., Mynatt, R. L. & Stephens, J. M. The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* 278, 2228–2235, <https://doi.org/10.1074/jbc.M205871200> (2003).
15. Helgren, M. E. et al. Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76, 493–504 (1994).
16. Watt, M. J. et al. CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 12, 541–548, <https://doi.org/10.1038/nm1383> (2006).
17. Ettinger, M. P. et al. Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* 289, 1826–1832, <https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1826> (2003).
18. Bays, H. E. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. *Obes Res* 12, 1197–1211, <https://doi.org/10.1038/oby.2004.151> (2004).
19. DeChiara, T. M. et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313–322 (1995).
20. Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R. A. & Thoenen, H. Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25, 1436–1453, <https://doi.org/10.1002/neu.480251110> (1994).
21. Stockli, K. A. et al. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920–923, <https://doi.org/10.1038/342920a0> (1989).
22. Takahashi, R. et al. A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7, 79–84, <https://doi.org/10.1038/ng0594-79> (1994).
23. Alexander, W. S. et al. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol* 9, 605–608 (1999).
24. Zou, X. et al. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Veterinary pathology* 46, 514–519, <https://doi.org/10.1354/vp.08-VP-0239-B-BC> (2009).

25. Forger, N. G. et al. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci* 23, 8854–8858 (2003).
26. Hahn, A. F. et al. Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J Neurol Sci* 293, 68–75, <https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.02.028> (2010).
27. Dagoneau, N. et al. Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am J Hum Genet* 80, 966–970, <https://doi.org/10.1086/513608> (2007).
28. Dagoneau, N. et al. Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet* 74, 298–305, <https://doi.org/10.1086/381715> (2004).
29. Knappskog, P. M. et al. Cold-induced sweating syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene. *Am J Hum Genet* 72, 375–383, <https://doi.org/10.1086/346120> (2003).
30. Sleeman, M. W., Anderson, K. D., Lambert, P. D., Yancopoulos, G. D. & Wiegand, S. J. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74, 265–272 (2000).
31. Schmidt-Ott, K. M. et al. Novel regulators of kidney development from the tips of the ureteric bud. *J Am Soc Nephrol* 16, 1993–2002, <https://doi.org/10.1681/ASN.2004121127> (2005).
32. Aljabari, S., Howard, E., Bell, T. & Vasylyeva, T. L. Cold induced sweating syndrome with urinary system anomaly association. *Case reports in pediatrics* 2013, 173890, <https://doi.org/10.1155/2013/173890> (2013).
33. McCarthy, E. T., Sharma, M. & Savin, V. J. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 2115–2121, <https://doi.org/10.2215/CJN.03800609> (2010).
34. Gbadegesin, R., Lavin, P., Foreman, J. & Winn, M. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatric nephrology* 26, 1001–1015, <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1692-x> (2011).
35. Candiano, G. et al. Apolipoproteins prevent glomerular albumin permeability induced in vitro by serum from patients with focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 143–150 (2001).

36. Koizumi, J. et al. Removal of apolipoprotein E-enriched high density lipoprotein by LDL-apheresis in familial hypercholesterolaemia: a possible activation of the reverse cholesterol transport system. *Atherosclerosis* 74, 1–8 (1988).
37. Kawasaki, Y. et al. Long-term efficacy of low-density lipoprotein apheresis for focal and segmental glomerulosclerosis. *Pediatric nephrology* 22, 889–892, <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0426-6> (2007).
38. Hattori, M. et al. A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 42, 1121–1130 (2003).
39. Gutman, C. R., Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H. & Matthew, W. D. Apolipoprotein E binds to and potentiates the biological activity of ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci* 17, 6114–6121 (1997).
40. Malek, G. et al. Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11900–11905, <https://doi.org/10.1073/pnas.0503015102> (2005).
41. Loane, E., McKay, G. J., Nolan, J. M. & Beatty, S. Apolipoprotein E genotype is associated with macular pigment optical density. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2636–2643, <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4397> (2010).
42. Sun, E. et al. Apolipoprotein E gene and age-related macular degeneration in a Chinese population. *Mol Vis* 17, 997–1002 (2011).
43. Joyal, J. S. et al. Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1. *Nat Med* 22, 439–445, <https://doi.org/10.1038/nm.4059> (2016).
44. Kauper, K. et al. Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 7484–7491, <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9970> (2012).
45. Thanos, C. G. et al. Sustained secretion of ciliary neurotrophic factor to the vitreous, using the encapsulated cell therapy-based NT- 501 intraocular device. *Tissue Eng* 10, 1617–1622, <https://doi.org/10.1089/ten.2004.10.1617> (2004).
46. Wen, R., Tao, W., Li, Y. & Sieving, P. A. CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res* 31, 136–151, <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.005> (2012).

47. Hatters, D. M., Budamagunta, M. S., Voss, J. C. & Weisgraber, K. H. Modulation of apolipoprotein E structure by domain interaction: differences in lipid-bound and lipid-free forms. *J Biol Chem* 280, 34288–34295, <https://doi.org/10.1074/jbc.M506044200> (2005).
48. Hatters, D. M., Peters-Libeu, C. A. & Weisgraber, K. H. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci* 31, 445–454, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.06.008> (2006).
49. Poirier, J. et al. Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 35(Suppl 2), S3–10, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.037> (2014).
50. Raffai, R. L. Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 23, 471–478, <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328356f967> (2012).
51. de Silva, H. V., Mas-Oliva, J., Taylor, J. M. & Mahley, R. W. Identification of apolipoprotein B-100 low density lipoproteins, apolipoprotein B-48 remnants, and apolipoprotein E-rich high density lipoproteins in the mouse. *Journal of lipid research* 35, 1297–1310 (1994).
52. Jawien, J., Nastalek, P. & Korbut, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 55, 503–517 (2004).
53. Wade, D. P., Knight, B. L. & Soutar, A. K. Detection of the low-density-lipoprotein receptor with biotin-low-density lipoprotein. A rapid new method for ligand blotting. *The Biochemical journal* 229, 785–790 (1985).
54. Krutzik, P. O., Hale, M. B. & Nolan, G. P. Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. *J Immunol* 175, 2366–2373 (2005).
55. Conference on Health Effects of Blood Lipids—Optimal Distributions for, P., Wynder, E. L. & American Health, F. Plasma lipids: optimal levels for health (1980).
56. Smith, L. E. et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 101–111 (1994).
57. Miloudi, K. et al. Assessment of vascular regeneration in the CNS using the mouse retina. *J Vis Exp*, e51351, <https://doi.org/10.3791/51351> (2014).

58. Bucher, F. et al. CNTF Attenuates Vasoproliferative Changes Through Upregulation of SOCS3 in a Mouse-Model of Oxygen-Induced Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 4017–4026, <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18508> (2016).
59. Larsen, J. V. et al. Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol Cell Biol* 36, 1272–1286, <https://doi.org/10.1128/MCB.00917-15> (2016).
60. Larsen, J. V. et al. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/ leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol* 30, 4175–4187, <https://doi.org/10.1128/MCB.00274-10> (2010).
61. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* 8, 921–929, <https://doi.org/10.1110/ps.8.4.921> (1999).
62. Cognet, I. et al. Expression of recombinant proteins in a lipid A mutant of Escherichia coli BL21 with a strongly reduced capacity to induce dendritic cell activation and maturation. *J Immunol Methods* 272, 199–210 (2003).
63. Crowe, J. et al. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31, 371–387, <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:371> (1994).
64. Tormo, A. J. et al. The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities. *Cytokine* 60, 653–660, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.08.014> (2012).
65. Szymczak, A. L. et al. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single ‘self-cleaving’ 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22, 589–594, <https://doi.org/10.1038/nbt957> (2004).
66. Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
67. Crabe, S. et al. The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling. *J Immunol* 183, 7692–7702, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901464> (2009).

68. Cognet, I. et al. Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells. *J Immunol Methods* 301, 53–65, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.03.012> (2005).
69. Sapieha, P. et al. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120, 3022–3032, <https://doi.org/10.1172/JCI42142> (2010).
70. Stahl, A. et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2813–2826, <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176> (2010).
71. Stahl, A. et al. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis* 12, 297–301, <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9155-3>

**Figure 1. CLCF1 binds recombinant and serum ApoE.** (A) Recombinant CLCF1 (200 ng) and ApoE2, 3 or 4 (250 ng) were incubated alone or in combination for 16 h. The samples were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-CLCF1 and protein G agarose. Immunoprecipitated proteins were analyzed by WB using mAbs specific for ApoE (upper panel) or CLCF1 (lower panel). Lanes “CLC 2 ng” and “ApoE3 20 ng”, show results of recombinant proteins directly subjected to SDS-PAGE and WB blot analysis. (B) CLCF1 and ApoE form a complex when co-expressed in HEK-293 cells. The cell culture medium from stable transfectants expressing the indicated proteins in combination with CLCF1 or from cells transfected with empty expression vector (lane D5) was subjected to immunoaffinity chromatography with rat-anti-human ApoE and anti-rat Ig Agarose. The eluates were analysed by WB using anti-ApoE or anti-CLC mAbs (upper panels). Supernatants of the stable transfectants were analyzed for the presence of ApoE or CLCF1 by WB (lower panels). (C and D) CLCF1 binds mouse and human serum ApoE. (C) Mouse serum samples isolated from WT or ApoE<sup>-/-</sup> mice were diluted 1:20, mixed with biotinylated mouse CLCF1 and the complexes immunoprecipitated with rabbit anti-mouse ApoE and anti-rabbit Ig agarose. The eluates were analysed for ApoE or CLCF1 by WB using anti-mouse ApoE or HRP-labelled streptavidin. The last two lanes show the signals obtained with 40 ng of biotinylated mouse CLCF1 or ApoE included as control. (D) Human serum samples were diluted 1:20, mixed with biotinylated human CLCF1 and the complexes immunoprecipitated with rat anti-ApoE and anti-rat Ig agarose. The eluates were analyzed for ApoE or CLCF1 by WB using anti-ApoE or HRP-labelled streptavidin. The last two lanes show the signals obtained with 40 ng of biotinylated human CLCF1 or ApoE included as control. Blots' images were cropped to show relevant areas.

**Figure 2. AlphaLISA proximity assay shows CLCF1-ApoE complex formation that is increased by the lipid DMPC.** (A) ApoE2, 3 or 4 were mixed with CLCF1 (10 nM) in PBS 0.1% BSA for 1 h with IgG rat anti-ApoE (3 nM) and anti-IgG rat acceptor beads (10 µg/mL). Streptavidin donor beads (40 µg/mL) were further added for 1 h and 615 nm fluorescence signal assessed. (B) The indicated ApoE isotypes (30 nM) were mixed at 37 °C with increasing amount of DMPC for 1 h. ApoE-DMPC mix were further incubated with CLCF1 and subjected to AlphaLISA proximity assay. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples ± SD.

**Figure 3. ApoE3 increases CLCF1-induced CNTFR activation.** (A) Ba/F3 transfected with CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA were successively incubated with mouse biotinylated CLCF1 (1  $\mu$ g/ml) alone or in the presence of ApoE3 (10  $\mu$ g/ml) and PE-labelled streptavidin and fluorescence was assessed by flow cytometry. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone. (B) Ba/F3-CNTFR were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or ApoE3 (10  $\mu$ g/ml) alone or in combination for 15 min. STAT3 tyrosine phosphorylation was assessed by intracellular staining with anti-pSTAT3 mAb and flow cytometry. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD.

**Figure 4. CLCF1 co-purifies or co-elutes with serum lipoprotein complexes.** (A) WT mouse, (B) human or (C) ApoE<sup>-/-</sup> mouse sera were mixed with corresponding biotinylated CLCF1. The mixtures were fractionated by FPLC using a Superose 6 HR 10/ column in order to obtain 40 fractions. The fractions were analyzed for ApoE or CLCF1 by WB using anti-ApoE or HRP-labelled streptavidin. The right lanes show the signals obtained with 40 ng of ApoE or biotinylated CLCF1 included as control. Blots' images were cropped to show relevant areas. fluorescence signal assessed. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD.

**Figure 5. Biotinylated LDL and VLDL bind CLCF1.** (A) Interaction between CLCF1 and lipoproteins was assessed using ligand blotting assays: 0.1–0.2  $\mu$ g of hCLC, or 1  $\mu$ g of BSA were subjected to non-reducing SDS- PAGE. Proteins were revealed by Coomassie blue staining (left section) or electro-transferred to nitrocellulose and incubated successively with 30  $\mu$ g/ml biotinylated VLDL, LDL or HDL and HRP-labeled neutravidin (middle 3 panels). Signal was revealed by chemiluminescence. Image in the far right section shows results of incubation with HRP-labeled neutravidin alone. Lane hCLC biot; 40 ng of biotinylated CLC was used as positive control for neutravidin detection. Blots' images were cropped to show relevant areas. (B) The formation of LDL and VLDL complexes can be detected using an AlphaLISA proximity assay. Biotinylated hCLCF1 was mixed with LDL, HDL and VLDL covalently coupled to acceptor beads (10  $\mu$ g/mL). Streptavidin donor beads (40  $\mu$ g/mL) were further added for 1 h and 615 nm



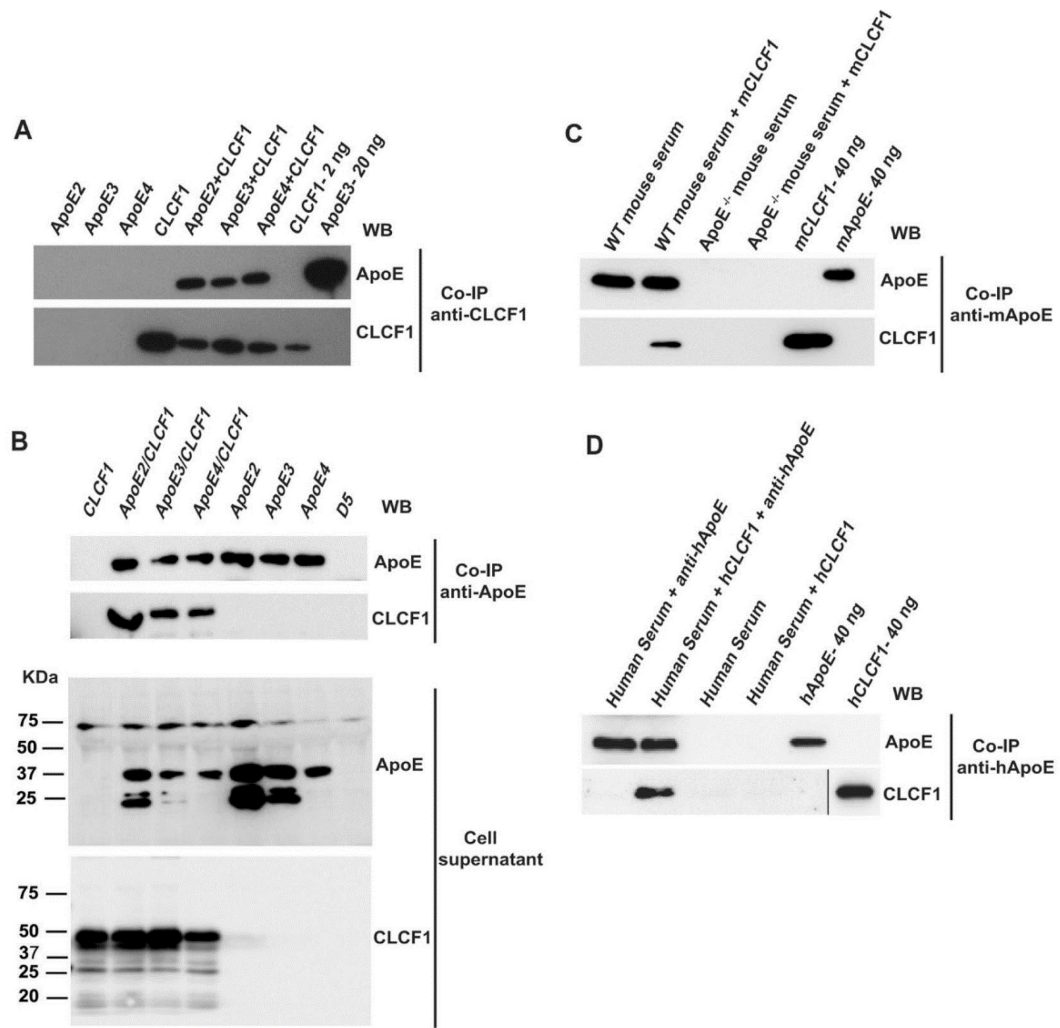
fluorescence signal assessed. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD.

**Figure 6. VLDL increases CLCF1 binding to CNTFR-expressing cells.** Ba/F3 transfected with CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA, IMR32 neuroblastoma or 3T3-L1 pre-adipocytes were successively incubated with species- matched biotinylated CLCF1 (1  $\mu$ g/ml) alone or in the presence of LDL, HDL or VLDL (all at 100  $\mu$ g/ml). Cells were then incubated with PE-conjugated streptavidin and fluorescence was assessed by flow cytometry. Vehicle: cells incubated with PE-streptavidin alone. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD.

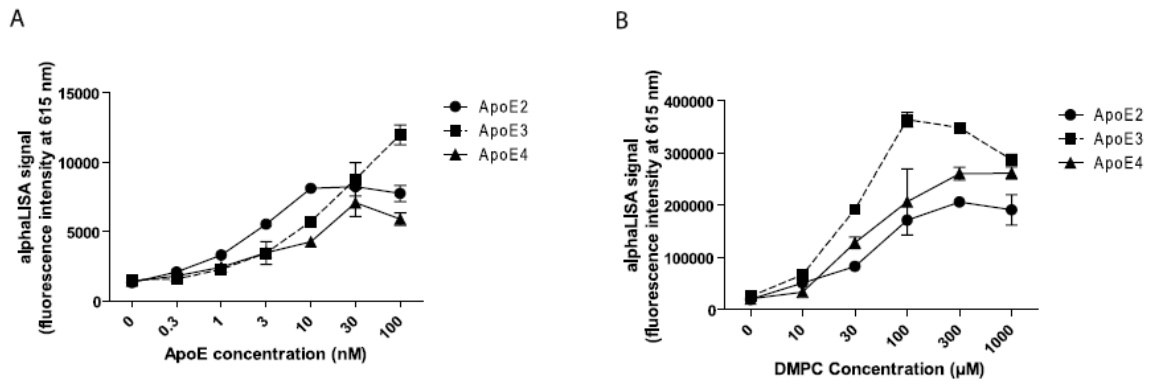
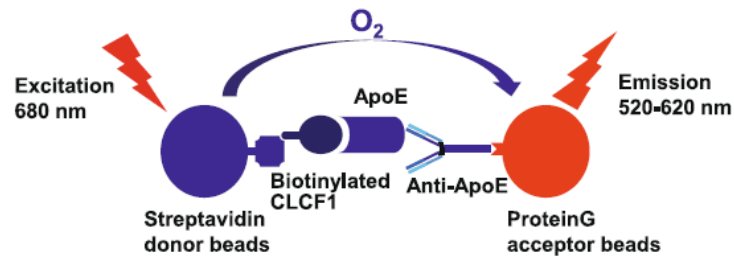
**Figure 7. Lipoproteins modulate CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation. (A,B)** Ba/F3 transfected CNTFR $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  cDNA were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100  $\mu$ g/ml) alone or in combinations for 15 min. **(C)** ARPE-19 retinal epithelial cells were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100  $\mu$ g/ml) alone or in combinations for 5 min. **(D)** Ba/F3-CNTFR were stimulated with CLCF1 (100 ng/ml) or lipoproteins (100  $\mu$ g/ml) alone or in combinations for 5–30 min. STAT3 tyrosine phosphorylation was assessed by Western Blot analysis **(A)** or by flow cytometry using intracellular staining with anti-pSTAT3 mAb **(B–D)**. Vehicle: unstimulated cells. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD. Western blot analysis **(A)** is representative of 3 independent experiments. Blots were probed with antibodies specific for STAT3 or its tyrosine phosphorylated form (pSTAT3).

**Figure 8. Treatment with CLCF1 or VLDL efficiently decreased oxygen-induced pathological neovascularization.** C57BL/6 WT mice were subjected to OIR and injected intravitreally at P12 with CLCF1 (intravitreal concentration 100 ng/mL), VLDL (intravitreal concentration 10 $\mu$ g/mL), a combination of CLCF1 and VLDL or vehicle. Results are expressed as percentage of **(A)** vaso-obiterated or **(B)** neovascular area versus the whole retinal area. Histograms bars represent mean value of percentage, and dots represent individual values $\pm$ SEM. **(C)** Representative retinal flatmount images are shown in with vaso-obiterated areas delimited

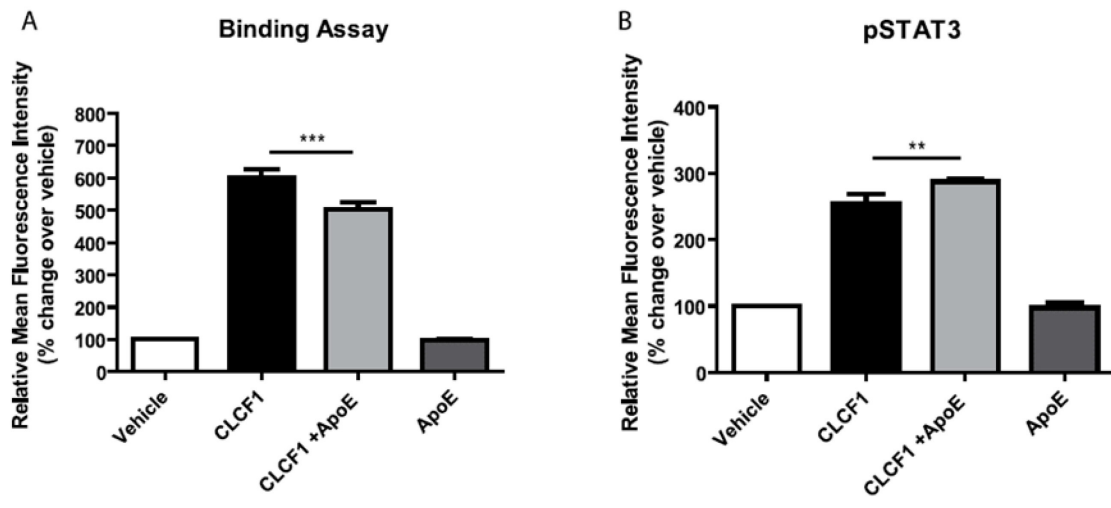
with dotted line. **(D)** Representative retinal flatmount images are shown with pre-retinal neovascularization outlined. Scale bars: 500 $\mu$ m.



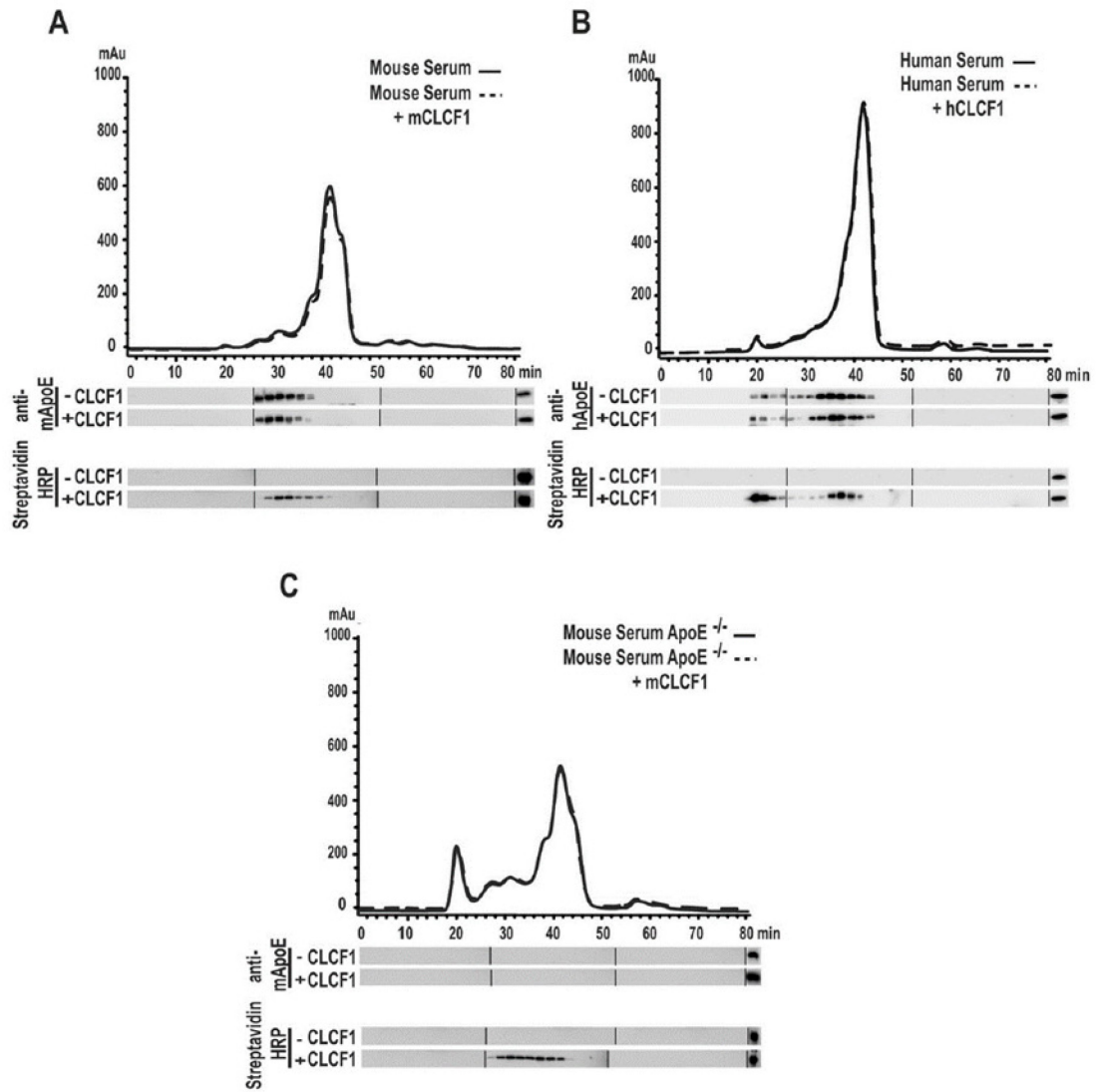
**Figure 1. CLCF1 binds recombinant and serum ApoE.**



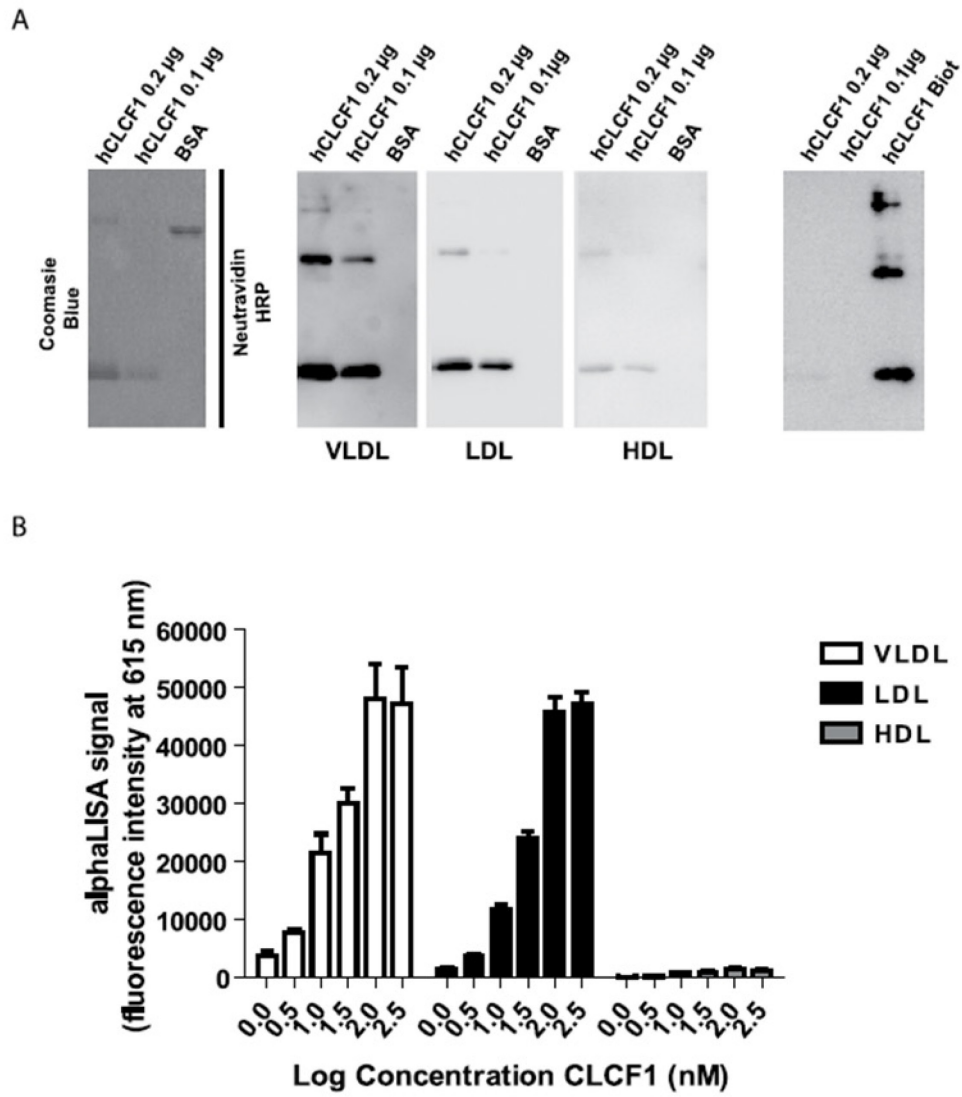
**Figure 2. AlphaLISA proximity assay shows CLCF1-ApoE complex formation that is increased by the lipid DMPC.**



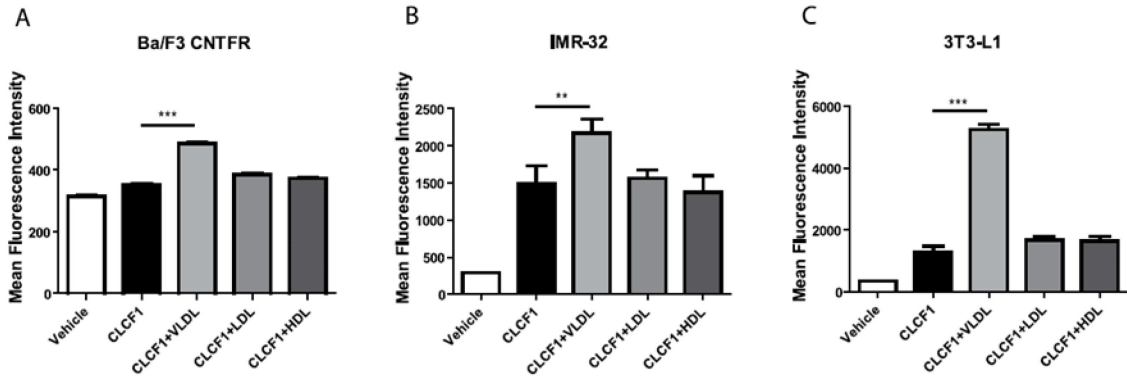
**Figure 3. ApoE3 increases CLCF1-induced CNTFR activation.**



**Figure 4. CLCF1 co-purifies or co-elutes with serum lipoprotein complexes.**

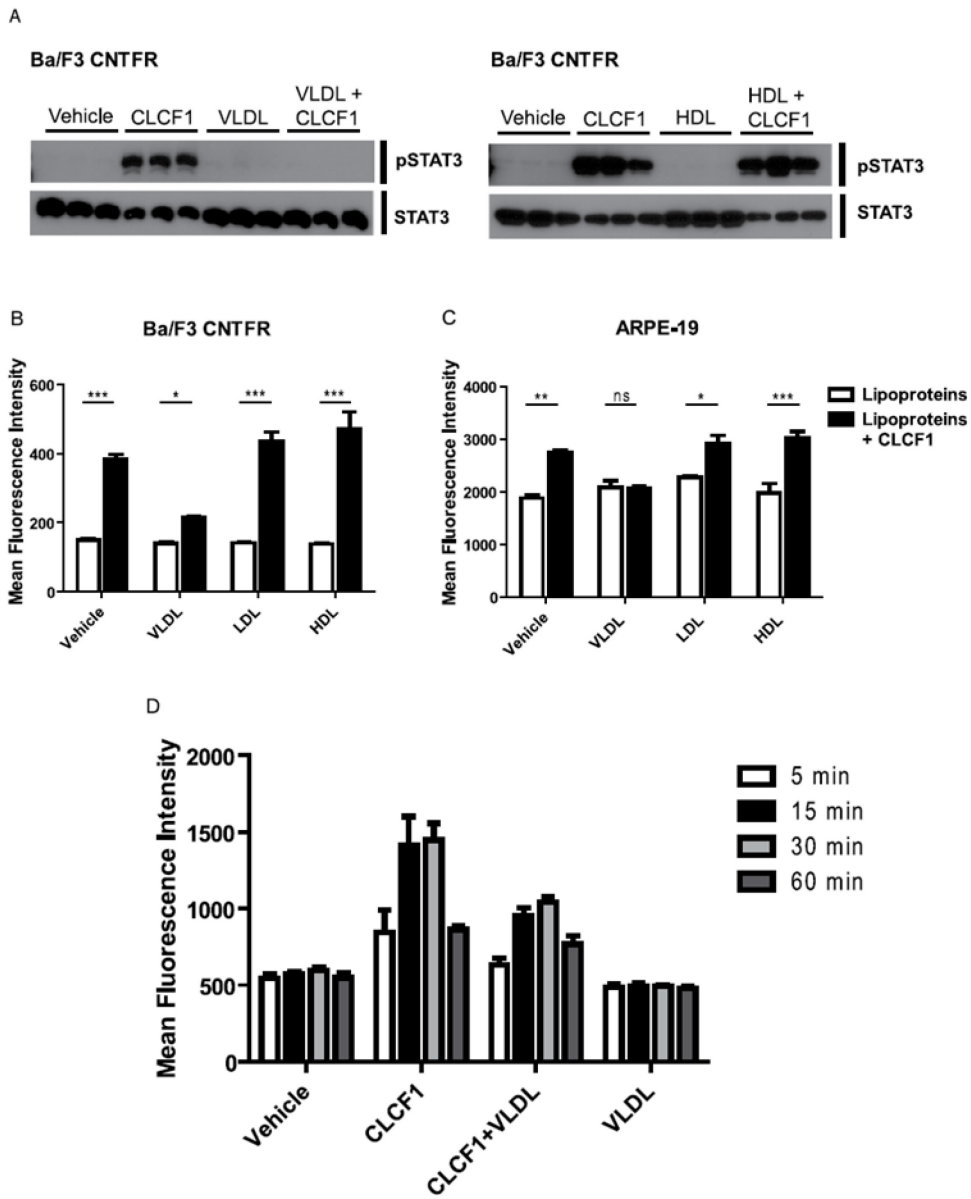


**Figure 5. Biotinylated LDL and VLDL bind CLCF1.**

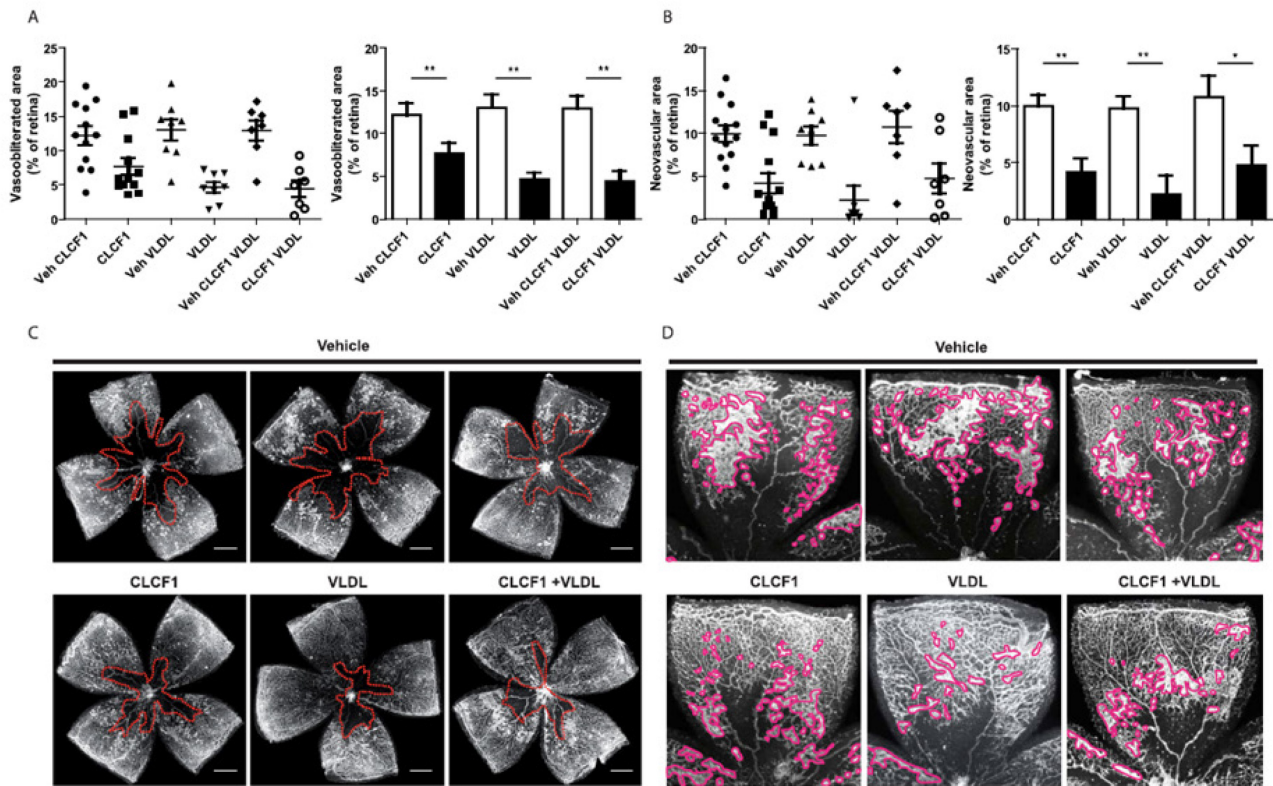


**Figure 6. VLDL increases CLCF1 binding to CNTFR-expressing cells.**





**Figure 7. Lipoproteins modulate CLCF1-induced STAT3 tyrosine phosphorylation.**



**Figure 8. Treatment with CLCF1 or VLDL efficiently decreased oxygen-induced pathological neovascularization.**

## Supplementary Information

### Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity

Sarah Pasquin<sup>1,†</sup>, Salma Chehboun<sup>1,†</sup>, Agnieszka Dejda<sup>2</sup>, Yasmine Meliani<sup>1</sup>, Virginia Savin<sup>3</sup>, Gregory, J. Warner<sup>4</sup>, Roger Bosse<sup>4</sup>, Aurélie Tormo<sup>1</sup>, Gaétan Mayer<sup>5</sup>, Mukut Sharma<sup>3</sup>, Przemyslaw Sapieha<sup>2</sup>, Catherine Martel<sup>6</sup> and Jean-François Gauchat<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Département de Pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

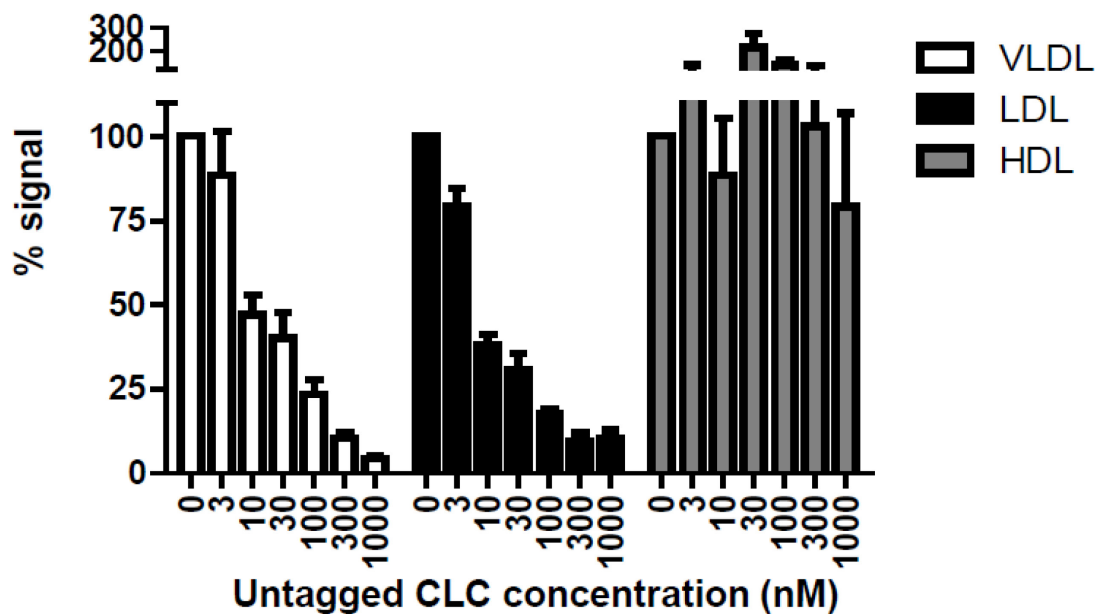
<sup>2</sup> Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada

<sup>3</sup> Renal Division, KCV Medical Center, Kansas City, MO 64128-2226, USA

<sup>4</sup> Perkin Elmer, 940 Winter Street, Waltham, MA 02451, USA

<sup>5</sup> Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, QC, H3T 1J4, Canada ¶

<sup>6</sup> Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada



**Figure S1. VLDL-CLCF1 and LDL-CLCF1 proximity assay signal can be competed-out using excess of non-biotinylated CLCF1.** Biotinylated hCLCF1 was mixed with LDL, HDL and VLDL covalently coupled to acceptor beads (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in presence of increased concentrations of unlabelled hCLC (as indicated in the figure). Streptavidin donor beads (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were further added for 1 h and 615 nm fluorescence signal assessed. Histograms indicate the mean fluorescence intensity of 3 independent samples  $\pm$  SD.

# Full-length gels and blots

kDa Figure 1-B

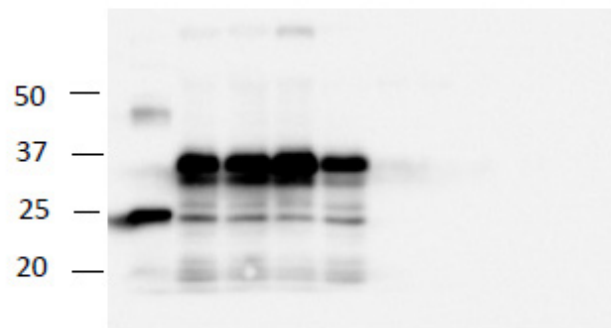
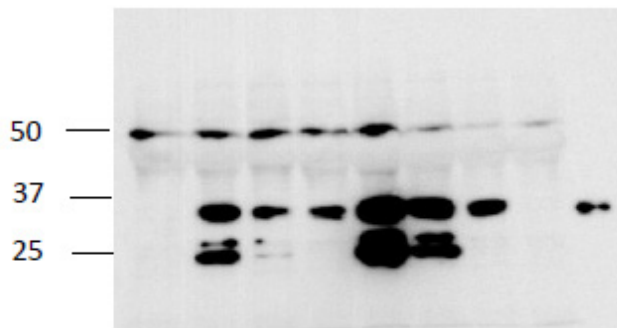
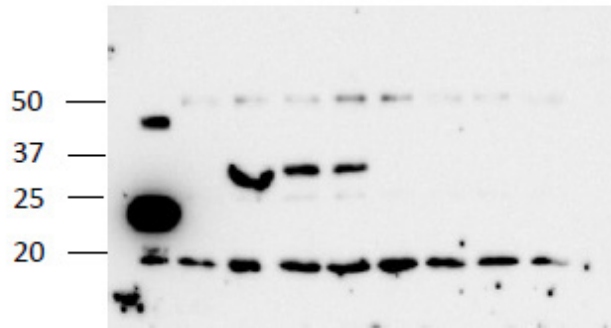
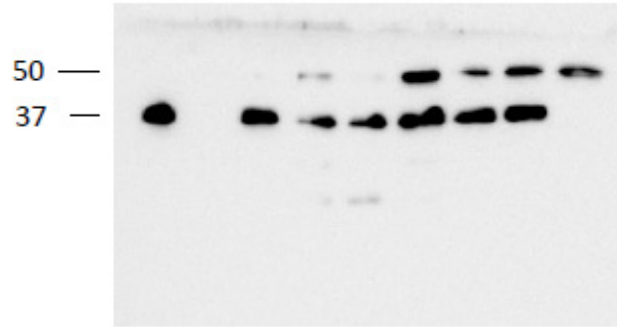


Figure 1-C

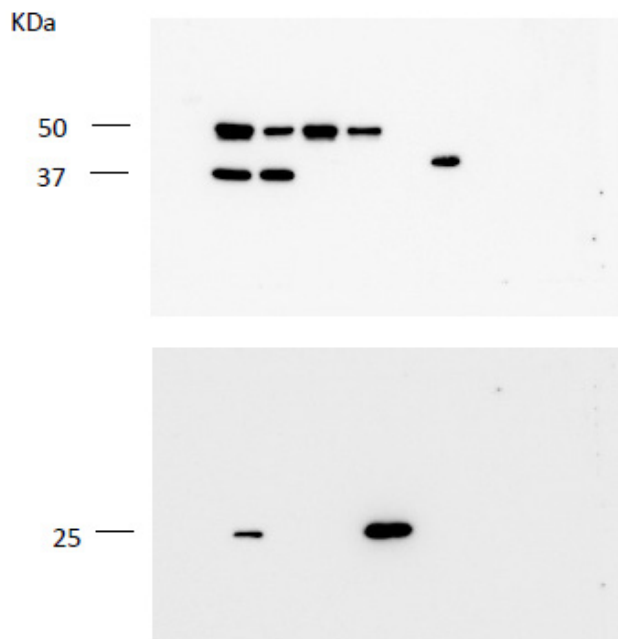


Figure 1-D

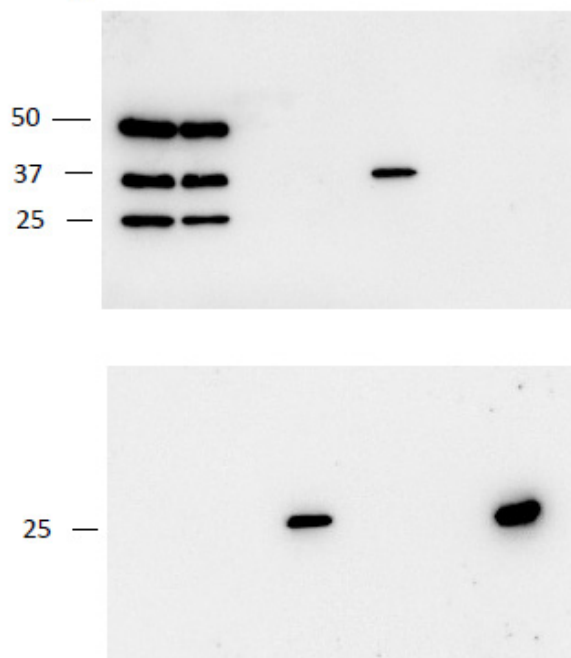


Figure 4-A

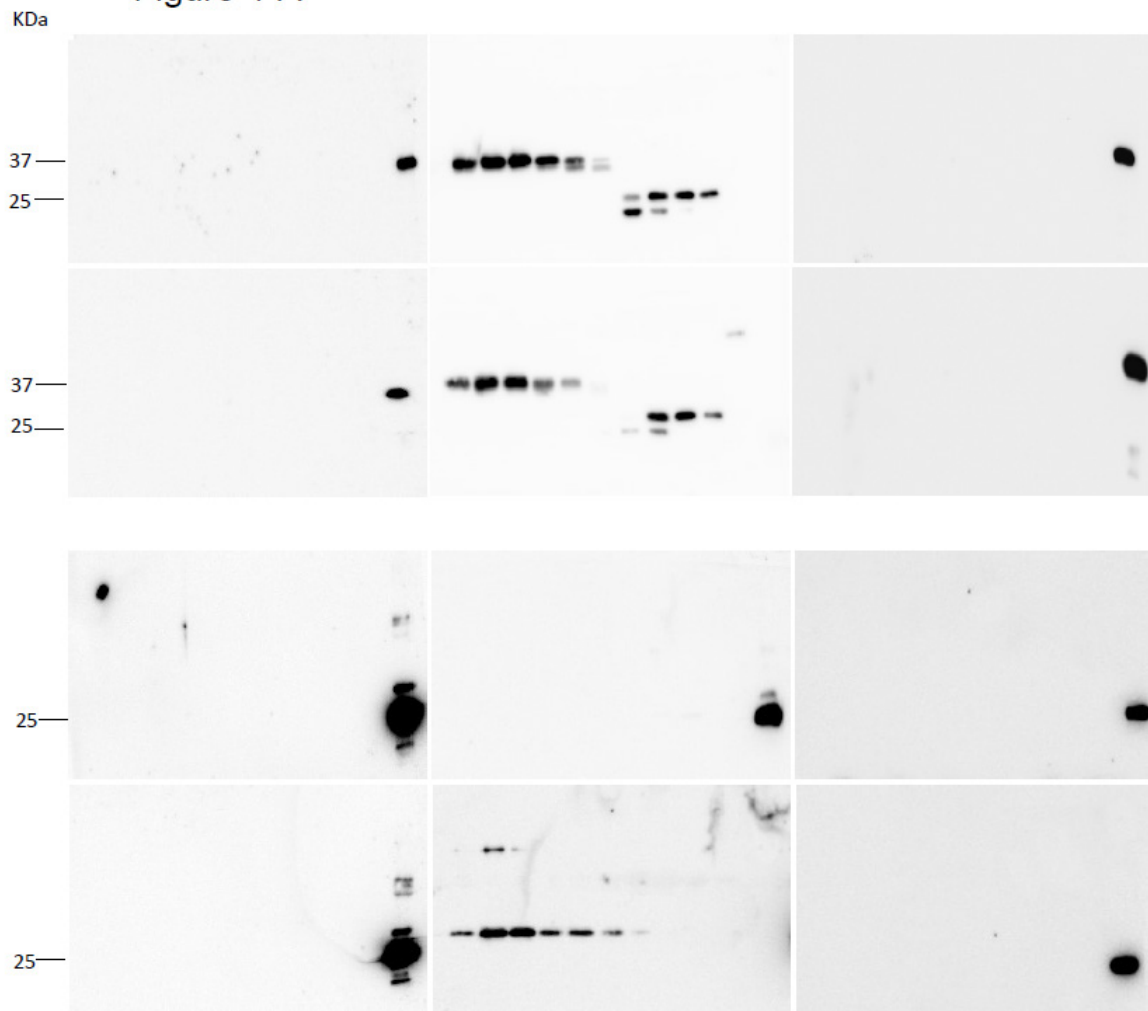


Figure 4-B

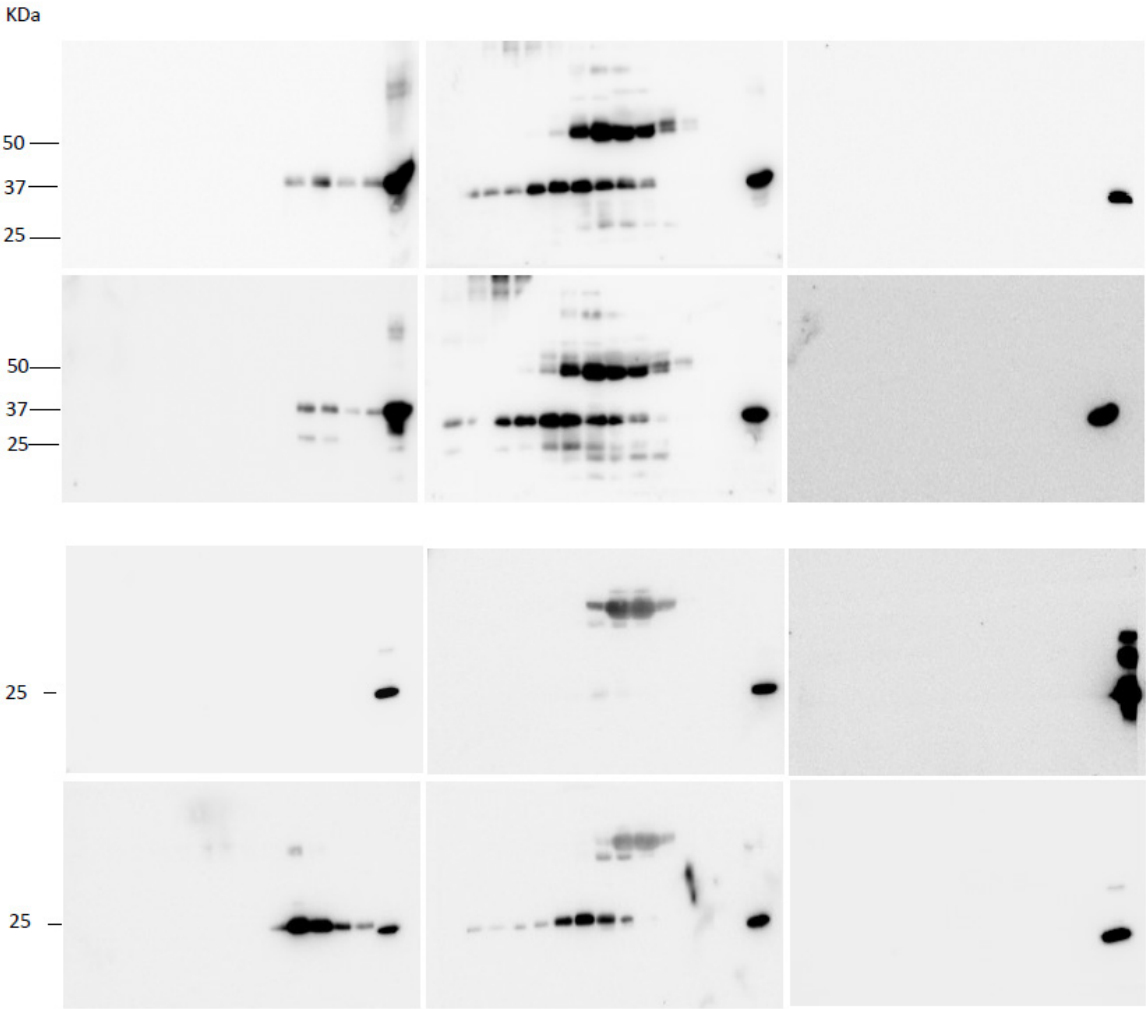




Figure 4-C

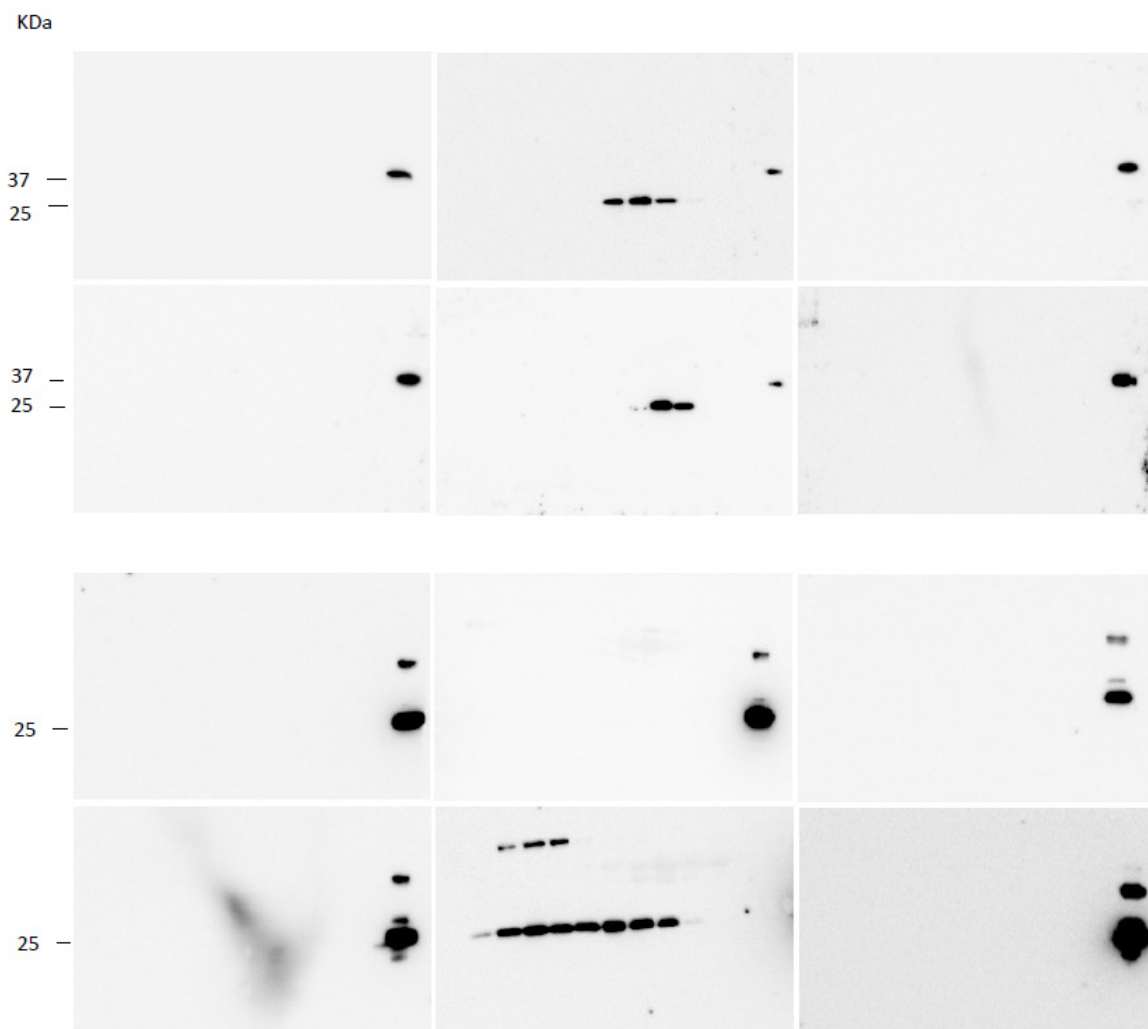
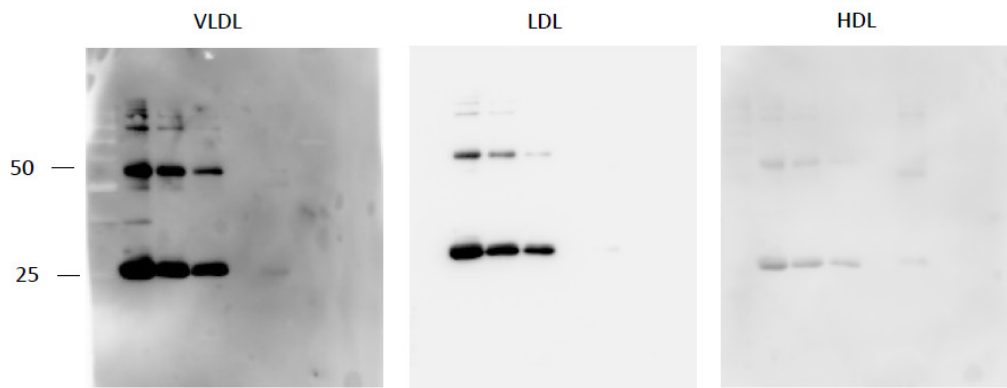


Figure 5-A



SDS-PAGE/Coomassie Blue

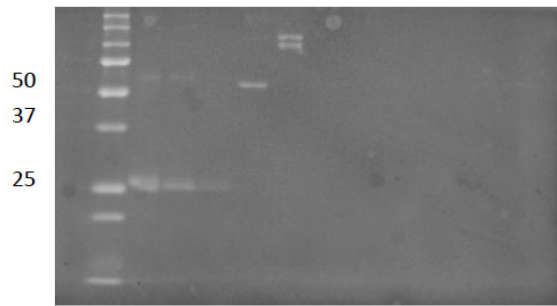
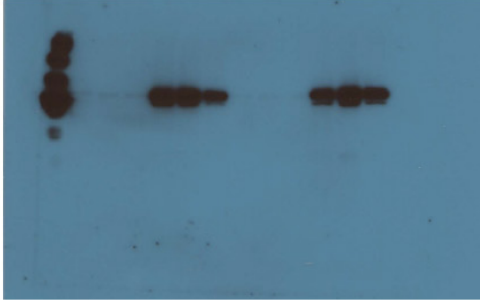
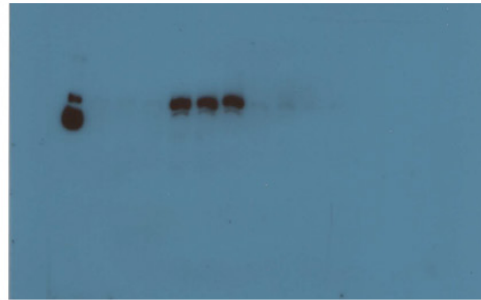


Figure 7-A

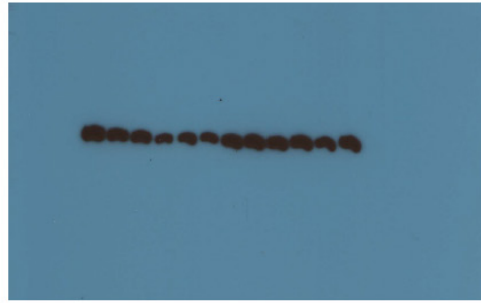
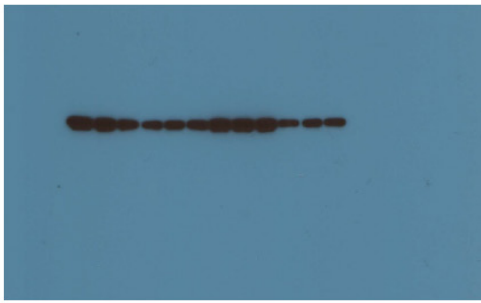
BaF3 CNTFR + HDL



BaF3 CNTFR + VLDL



pSTAT3



STAT3

Description des analyses statistiques effectuées dans l'article *Effect of human very low-density lipoproteins on cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) activity*.

### **Statistical analysis**

For statistical analysis, one-way ANOVA with a Bonferroni post hoc test was used for Figure 3, 6 and 7. One-way ANOVA with a Newman Keuls post hoc test was used for Figure 8. Results presented in figures are marked using asterisks: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ . Data were analyzed using GraphPad prism software (GraphPad, La Jolla, CA).

## **IV. Discussion et perspectives**

Identifiée en 1999, CLCF1 est une cytokine de la famille de l'IL-6 dont les activités immunorégulatrices demeurent à ce jour peu étudiées et peu comprises (83, 84). Des mutations dans les gènes codant pour CLCF1 ou son partenaire de sécrétion le CRLF1 mènent au développement des syndromes de CISS et de Crisponi (107). L'étude des phénotypes de ces patients suggère des rôles prépondérants pour CLCF1 dans le développement et la régulation du système immunitaire (108). L'objectif principal de cette thèse visait donc à définir et caractériser les rôles immunomodulateurs de CLCF1. Nous avons d'abord identifié un fort potentiel hématopoïétique de CLCF1; nos travaux de recherche ont en effet permis d'identifier des fonctions biologiques de la cytokine dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques ainsi que dans l'induction de la myélopoïèse. Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence un rôle de CLCF1 dans l'activation des macrophages ainsi que dans la formation des cellules spumeuses. Finalement, nous avons observé la capacité de CLCF1 à lier l'apolipoprotéine E et les lipoprotéines plasmatiques, nos résultats suggèrent également que les lipoprotéines de très faible densité sont en mesure d'influencer les activités biologiques de cette cytokine.

La prochaine section de cette thèse a pour objectif d'élaborer de plus amples perspectives de recherche en lien avec les résultats obtenus plutôt que de répéter le contenu des discussions des publications du précédent chapitre. Cette discussion abordera également des avenues de recherche reliées à des résultats préliminaires n'ayant pas fait l'objet de publication, mais qui pourraient être pertinentes pour l'étude future des fonctions immunorégulatrices du CLCF1.

### **Les fonctions hématopoïétiques de CLCF1**

Tel que détaillé dans le chapitre 2, plusieurs cytokines de la famille de l'IL-6 possèdent des fonctions importantes dans l'hématopoïèse. Nous avons émis l'hypothèse que de telles fonctions étaient envisageables pour CLCF1. Notre hypothèse était supportée par le fait que les souris hétérozygotes pour CLCF1 arborent une concentration diminuée de leucocytes en circulation et

que les souris *CLCF1*<sup>-/-</sup> présentant un défaut de sécrétion de CLCF1 ont 2.6 fois moins de cellules souches hématopoïétiques à la naissance (99). Les résultats obtenus dans ce premier projet de recherche nous ont permis de valider notre hypothèse de travail en démontrant des fonctions claires de CLCF1 dans l'expansion des CSH *in vitro* ainsi qu'un rôle inattendu de CLCF1 dans l'induction de la myélopoïèse.

La première partie de cet article démontre la capacité de CLCF1 à induire de manière indirecte la prolifération des LSK murins. En culture, l'effet de CLCF1 est dose-dépendante et médié notamment par la sécrétion d'un cocktail de médiateurs solubles comprenant l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10, du G-CSF et du VEGF. *In vivo*, l'administration de CLCF1 recombinant a été testée dans différents contextes, soit: dans des souris saines, dans un contexte d'hématopoïèse d'urgence après irradiation et dans un modèle de transplantation congénique de moelle osseuse. Dans ces trois modèles, l'administration de CLCF1 a induit un effet marqué sur la myélopoïèse en augmentant de manière très significative le nombre de cellules CD11b<sup>+</sup> en circulation et dans les organes lymphoïdes. Les expériences de transplantation de moelle osseuse ont également démontré que CLCF1 induit une accélération très significative de la reconstitution du système immunitaire. Les souris ayant reçu des injections de la cytokine recombinante ont retrouvé des comptes normaux de cellules immunes en circulation deux semaines avant les contrôles.

Ce projet de recherche a permis une première analyse sommaire des effets de CLCF1 dans la régulation de l'hématopoïèse. Plusieurs de ces observations devront être approfondies afin de mieux caractériser les fonctions hématopoïétiques de cette cytokine.

Les expériences d'expansion des LSK réalisées à partir de milieu conditionné suggèrent que l'effet de CLCF1 est médié par l'activation d'une ou de plusieurs populations cellulaires agissant à titre d'intermédiaires. Une des premières perspectives de recherche associée à ces résultats serait d'identifier la nature des cellules répondant au CLCF1. Des expériences préliminaires effectuées en ce sens suggèrent que l'action de CLCF1 est médiée via l'activation d'une population de progéniteurs immunitaires. En effet, la déplétion par billes magnétiques des cellules immunes matures de la moelle osseuse n'a pas éliminé ou réduit l'expansion des CSH en réponse à la cytokine (Figure S1, annexe 3). Malheureusement, la différenciation rapide des

progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* combinée à un manque de pureté dans les expériences d'isolation des sous-types cellulaires nous a empêchés d'identifier avec précision la population cellulaire répondant à CLCF1.

Il est également important de considérer que la technique utilisée pour récolter les cellules immunes de la moelle osseuse permet de récupérer une petite quantité de cellules stromales. Il serait donc envisageable que l'action indirecte de CLCF1 sur les CSH ne provienne pas des progéniteurs hématopoïétiques, mais d'une activation des cellules CD45<sup>+</sup>, un aspect qui n'a pas été testé lors de notre étude. Parmi les cellules stromales, les MSC ont été démontrées pour avoir des rôles marqués dans la régulation de l'hématopoïèse (284). Les travaux récents de S. Nahlé, étudiante dans le laboratoire du Dr Gauchat, ont démontré la capacité de CLCF1 à induire l'activation des voies de signalisation JAK/STAT1 et JAK/STAT3 dans des cultures de MSC murines (Figure S2, annexe 3). Il serait donc intéressant de comparer l'effet prolifératif de CLCF1 sur les LSK en présence ou en absence de cellules stromales.

L'identification de la ou des populations responsables des fonctions hématopoïétiques de CLCF1 pertinente. Cette information s'ajouterait à nos connaissances des fonctions biologiques de cette cytokine, et nous permettrait d'évaluer l'étendue du potentiel thérapeutique de CLCF1. Considérant l'effet prolifératif de CLCF1 sur les LSK murins et les CSH de singes (Figure S3, annexe 3), cette cytokine pourrait être à considérer dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques visant à expandre les CSH. L'expansion *ex-vivo* des CSH est une stratégie thérapeutique largement étudiée pour améliorer et accélérer la reconstitution du système immunitaire des patients soumis à une greffe de cellules immunes. La faible quantité de CSH présent dans le sang de cordon ombilical et dans les prélèvements de moelles osseuses limite actuellement le taux de succès de cette intervention médicale. Ainsi, de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'identification de petites molécules ou de facteurs de croissance permettant d'augmenter en culture le nombre des cellules souches disponibles pour transplantation. L'efficacité potentielle de CLCF1 dans ce type d'application thérapeutique dépendra toutefois de la nature de la population cellulaire responsable des effets prolifératifs de CLCF1. Par exemple, si CLCF1 agit sur les LSK par l'entremise de cellules stromales, son usage thérapeutique serait probablement compromis dans un protocole d'expansion utilisant que des

cellules souches triées ou purifiées, mais pourrait être envisagée dans un protocole d'expansion impliquant la coculture de cellules stromales (285).

Alors que CLCF1 semble avoir des effets marqués dans la reconstitution de cellules myéloïdes, notre cytokine n'a pas été en mesure d'accélérer la reprise des lymphocytes T dans les expériences de transplantation. La reconstitution des lymphocytes T est nécessaire à la mise en place du système immunitaire adaptatif compétent. Les taux sériques de lymphocytes T chez les patients greffés sont corrélés avec la survie à long terme des patients (286). L'élaboration d'une thérapie impliquant seulement l'administration de CLCF1 afin d'accélérer la reconstitution immunitaire des patients est donc peu envisageable. Cela dit, il serait pertinent de tester le potentiel de CLCF1 dans une stratégie combinatoire impliquant l'utilisation de petites molécules thérapeutiques (par exemple, UM171) ou des facteurs de croissances et cytokines (SCF, TPO, IL-6) déjà utilisées dans ce type d'interventions (154).

L'identification des cellules répondant au CLCF1 serait également d'une grande aide en ce qui concerne la recherche d'un second récepteur pour cette cytokine. Les rôles neurotrophiques de CLCF1 sont médiés par l'activation du récepteur au CNTF, toutefois la chaîne CNTFR $\alpha$  n'étant pas exprimée par les cellules immunes, l'existence d'un second récepteur de CLCF1 a été suggérée. Ainsi, en établissant par quelles cellules immunes CLCF1 permet l'expansion des CSH, nous pourrions restreindre la liste de récepteurs potentiels de CLCF1 aux chaînes réceptrices exprimées par ce sous-type cellulaire.

Les études de signalisation effectuées sur les CSH purifiées nous ont amenés à conclure que CLCF1 n'active pas directement les LSK. Il est important de noter qu'en raison de certaines limitations expérimentales nos recherches se sont concentrées sur la phosphorylation des STAT. Par conséquent, il est nécessaire de rester prudent dans l'interprétation de ces résultats. L'isolation d'un nombre suffisant de LSK pour la réalisation d'études de signalisation est un travail exigeant qui demande une très grande quantité de cellules de moelle osseuse de souris et représente un coût important. Ne connaissant pas la nature exacte du récepteur hématopoïétique de CLCF1, cette cytokine pourrait activer d'autres voies de signalisation que celles des STAT par exemple mTOR ou MAPK. Ainsi, des expériences de signalisation supplémentaires seraient



utiles pour conclure avec certitude de l'incapacité de CLCF1 à activer directement les CSH. D'un point de vue expérimental, l'utilisation d'anticorps de surfaces, nécessaire au tri des LSK par cytométrie en flux, pourrait également avoir empêché la liaison de CLCF1 à une chaîne de récepteur impliqué dans sa signalisation.

*In vivo*, l'administration de CLCF1 a conduit à une induction rapide de myélopoïèse, c'est-à-dire la production de cellules myéloïdes comme les monocytes, les macrophages et les granulocytes. Chez les souris ayant subi une transplantation congénique de cellules immunes, l'injection de CLCF1 a grandement accéléré la reconstitution des cellules myéloïdes dans plusieurs compartiments (moelle osseuse, sang et rate). Les taux circulants de cellules CD11b<sup>+</sup> ont atteint le nombre standard de cellules myéloïdes en circulation 4 semaines seulement après transplantation. CD11b est un marqueur commun de la lignée myéloïde murine, les marquages effectués dans ce projet nous informent donc de la présence d'une population cellulaire hétérogène constituée de monocytes, macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles et éosinophiles plutôt qu'un type cellulaire particulier. Des expériences de phénotypages supplémentaires seraient très intéressantes pour approfondir si CLCF1 favorise la formation d'un type particulier de cellules myéloïdes ou de myéloblastes. Par exemple, un marquage de surface incluant les anticorps CD11b, CD11c, F4/80, Ly6C, Ly6G et siglec-F, nous permettrait de distinguer adéquatement parmi les différentes populations de cellules myéloïdes.

Chez les patients, la quantité de neutrophiles en circulation est un paramètre très important pour évaluer la susceptibilité aux infections. Advenant un effet de CLCF1 dans l'augmentation de la production de neutrophiles, l'administration de cette cytokine pourrait être envisagée chez des patients neutropéniques afin d'augmenter l'immunité innée et de restreindre leurs risques d'infections. Si CLCF1 engendre la production d'éosinophiles, il serait intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette cytokine dans un contexte d'infection parasitaire ou encore d'étudier si cette cytokine serait une cible pertinente dans des pathologies comme l'asthme, l'atopie et l'hypersensibilité de type I. Une augmentation de la production de monocytes par CLCF1 pourrait se traduire par plusieurs perspectives de recherche. Les monocytes et macrophages jouent des rôles prépondérants dans la réponse antitumorale, dans l'athérosclérose ainsi que dans les maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques. L'administration de

CNTF recombinant dans un modèle murin EAE a eu pour effet de diminuer de manière significative le score clinique des souris comparativement au contrôle (80). Considérant l'effet de CLCF1 dans la myélopoïèse, il serait intéressant d'évaluer si cette cytokine a des effets bénéfiques similaires à son homologue ou si elle représenterait plutôt une cible à bloquer dans un contexte de sclérose en plaques.

Les cellules myéloïdes arborent une grande capacité phagocytaire et consistent donc en des éléments essentiels à l'immunité innée et l'élimination des pathogènes. Dans un contexte d'infection aiguë, le système hématopoïétique est en mesure d'accroître rapidement la quantité de cellules myéloïdes en circulation. Notamment, lors d'infections bactériennes, virales ou parasitaires, il se produit une reprogrammation du système hématopoïétique afin de favoriser la production rapide de cellules myéloïdes effectrices, un phénomène appelé la myélopoïèse d'urgence. La myélopoïèse d'urgence est un processus immunitaire très important pour répondre aux changements rapides d'états et aux nombreuses demandes de défense de l'organisme. L'incapacité d'un organisme à s'adapter à une demande accrue en cellules immunes matures peut induire des risques d'infections graves. Par exemple, la myélosuppression induite par chimiothérapie augmente de manière substantielle le risque de septicémies chez les patients cancéreux (287).

La myélopoïèse d'urgence requiert l'activation, la prolifération et la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques présents dans la moelle osseuse afin de produire un biais de production vers les cellules myéloïdes. Récemment, l'activation des CSH a aussi été démontrée jouer un rôle dans cette reprogrammation hématopoïétique (288-290). Les cellules myéloïdes formées dans un contexte d'hématopoïèse d'urgence proviennent majoritairement des progéniteurs multipotents (MPP) communément appelés MPP2 et MPP3 (138). Les MPP2 sont responsables de la formation de mégacaryocytes, alors que les MPP3 sont la source de granulocytes et de macrophages. Ces deux sous-types de MPP sont présents en plus faible proportion dans l'hématopoïèse normale laissant place à une plus grande quantité de MPP4 (responsable de la formation des lignées lymphoïdes); un tel ratio de progéniteurs est nécessaire au maintien d'un système immunitaire équilibré (288). En condition inflammatoire, le ratio de MPP2 et MPP3 augmente afin de produire un plus grand nombre d'effecteurs myéloïdes, une

partie des MPP4 est également reprogrammée afin d'acquérir des caractéristiques de type MMP2 et MPP3 (288). L'activation rapide des MPP et la reprogrammation des CSH peuvent être induites par une activation directe des cellules ou via la sécrétion de médiateurs inflammatoires solubles (288). Les résultats observés avec CLCF1 dans les expériences d'irradiations sous-létales et de transplantation de moelle osseuse suggèrent que cette cytokine serait un facteur impliqué dans la myélopoïèse d'urgence. La forte quantité de cellules CD11b<sup>+</sup> dans la moelle osseuse et dans le sang des souris traitées au CLCF1 indique en effet que CLCF1 pourrait activer une telle reprogrammation du système hématopoïétique. Cette hypothèse est supportée par le fait que gp130, l'IL-6, l'IL-27 et l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT ont tous été démontrés pour être fortement impliqués dans ce processus (291).

La myélopoïèse d'urgence est une étape bénéfique, voire même essentielle, dans l'inflammation aiguë. Toutefois, elle peut être très délétère dans un contexte d'inflammation chronique. La stimulation trop soutenue de l'hématopoïèse en condition inflammatoire chronique peut mener à l'épuisement et à l'altération des fonctions des MPP et des CSH (292). D'autre part, la persistance des signaux pro-inflammatoires induit un stress de prolifération sur le système hématopoïétique pouvant mener au développement de cancers hématopoïétiques. Ceci est notamment observable dans les maladies auto-immunes chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et le lupus qui sont associées à un risque accru de leucémies myéloïdes (293). Il serait donc intéressant d'évaluer si le fort effet prolifératif des CSH induit par CLCF1 mène à l'épuisement des CSH et/ou au développement de cellules leucémiques.

Outre la myélopoïèse d'urgence, le vieillissement des CSH est également un facteur influençant la reprogrammation de l'hématopoïèse vers un biais myéloïde. Au cours du vieillissement, la capacité d'autorenouvellement des CSH diminue alors que l'expression de surface du marqueur CD150 est augmentée (294). On dénote alors une augmentation du nombre de CSH-biaisées pour les cellules myéloïdes et de MPP2 et MPP3 ayant pour effet de diminuer graduellement la quantité de lymphocytes B et T produites et d'augmenter la production des cellules myéloïdes (295). Ainsi, la myélopoïèse en vient à dominer sur la lymphopoïèse. Avec l'âge, le système immunitaire devient donc plus dépendant de l'immunité innée alors que les fonctions de l'immunité adaptative sont fortement diminuées. De plus, les cellules myéloïdes

produites dans un de contexte d'inflammation liée à l'âge ou «*Inflamm-aging*» ont également été démontrées pour être moins fonctionnelles que les cellules myéloïdes formées lors de l'hématopoïèse normale (296). L'immunosénescence est accompagnée d'une production accrue de cytokines pro-inflammatoires comprenant notamment l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , une signature de cytokine appelée phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP) (297). Sur des cultures de cellules de moelle osseuse, CLCF1 induit une forte production de cytokines inflammatoires faisant partie du SASP, dont des quantités importantes d'IL-6. Il a aussi été démontré expérimentalement que l'augmentation de la capacité proliférative des CSH peut mener à la sénescence ces cellules (298, 299). En culture, nos expériences suggèrent que CLCF1 induit une augmentation majeure de la prolifération des LSK. Il serait donc intéressant de vérifier si CLCF1 est un facteur promouvant la sénescence du système hématopoïétique, surtout si cette cytokine vient à être considérée comme stratégie thérapeutique.

Advenant que CLCF1 soit un facteur d'induction de la myélopoïèse générale sans pour autant induire la formation de leucémies myéloïdes ou la sénescence cellulaire, les fonctions hématopoïétiques de CLCF1 pourraient être utiles dans différentes applications cliniques. Afin d'optimiser le potentiel thérapeutique de la cytokine, quelques modifications pourraient être effectuées sur la protéine afin d'augmenter son efficacité. La majorité de l'hématopoïèse s'effectue au niveau médullaire, un ciblage de CLCF1 vers l'os permettrait d'améliorer ses fonctions hématopoïétiques. Les travaux de C.E. Tye et plus récemment de A. Tormo ont démontré que la présence d'une séquence polyglutamatergique dans la sialoprotéine osseuse (BSP) et dans l'IL-27 favorise la liaison de ces molécules à l'os (300, 301). Une perspective de recherche future serait d'étudier si l'ajout d'une séquence polyE à l'extrémité de CLCF1 permettrait d'améliorer le ciblage de la cytokine à la moelle osseuse et d'accentuer ses rôles dans la myélopoïèse. Il serait également envisageable de modifier le site 1 de liaison de la cytokine afin de créer un biais pour ces fonctions immunomodulatrices. En effet, la mutation de l'acide aminé 94 de CLCF1 permet d'inhiber sa liaison à la chaîne CNTFR alpha tout en maintenant sa capacité d'expandre les CSH (Figure S4., annexe 3). Dans un contexte d'injections péritonéales ou systémiques, cette modification de CLCF1 pourrait limiter la capture de la cytokine par les cellules musculaires squelettiques ou le système nerveux périphérique et donc logiquement permettre à une quantité supérieure de la cytokine d'agir sur

les cellules immunes. Ainsi, la création d'un CLCF1 muté pour le site 1 comprenant une étiquette polyE pourrait être une stratégie intéressante advenant que les études futures des fonctions hématopoïétiques de CLCF1 dirigent cette cytokine vers des essais cliniques.

## **Les effets proathérogènes de CLCF1**

Prenant en considération l'effet marqué de CLCF1 dans l'induction de la myélopoïèse, nous avons poursuivi notre étude des rôles immunomodulateurs de CLCF1 en évaluant sa capacité à moduler la fonction des cellules myéloïdes. Initialement, CLCF1 a été identifié par le laboratoire de G. Senaldi comme un facteur de stimulation des lymphocytes B (83). Mise à part son effet prolifératif sur la lignée cellulaire M1, rien dans la littérature n'indiquait des fonctions biologiques de cette cytokine dans l'activation des cellules myéloïdes (83, 95). Par conséquent, nous avons commencé par tester la capacité de CLCF1 à induire l'activation des macrophages *in vitro* en utilisant le modèle classique des macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM). Une nette augmentation de la phosphorylation de STAT1 et STAT3 a été détectée dans les BMDM en réponse à CLCF1. Ceci suggère que la cytokine peut induire la signalisation JAK/STAT dans les macrophages qui pourrait influencer leur différenciation. La signalisation engendrée par CLCF1 a par ailleurs favorisé la production d'une panoplie de cytokines et chimiokines par les BMDM. Cependant, le profil de sécrétion de cytokines produites par les BMDM en réponse à CLCF1 n'est pas caractéristique d'une polarisation pro-inflammatoire dite classique (M1) ou d'une polarisation anti-inflammatoire dite alternative (M2) (302). La stimulation des BMDM par notre cytokine d'intérêt a également mené à l'augmentation de l'expression de surface du récepteur éboueur SR-A1. L'élévation des niveaux de SR-A1 est liée à une augmentation très significative de la formation de cellules spumeuses en culture en réponse à CLCF1. Cet article établit donc une première évidence des fonctions de CLCF1 dans l'activation des macrophages et suggère des rôles proathérosclérotiques pour cette cytokine.

Dans le 2<sup>e</sup> article présenté dans cette thèse, nous avons démontré que CLCF1 induit l'activation des BMDM sans pour autant favoriser la polarisation des cellules vers un phénotype M1 ou M2. La nomenclature M1 et M2 consiste en une classification très simplifiée de l'état d'activation des cellules myéloïdes en réponse à l'inflammation (302). Les macrophages acquièrent plutôt une vaste série d'états fonctionnels selon le stade inflammatoire dans lequel ils se retrouvent ou

en réponse à différents stimuli. Ainsi, au cours des dernières décennies plusieurs autres sous-types de polarisation ont été caractérisés afin de mieux représenter l'état fonctionnel des macrophages. Par exemple, les macrophages M2 sont maintenant divisés en trois sous-types différents en fonction du signal d'activation (IL-4/IL-13, ligands TLR ou IL-10) (302). Une polarisation de type M3 a également été décrite par C. Jakcamman dans un contexte de progression tumorale (303). Ces cellules, présentes à l'intérieur des tumeurs, arborent une polarisation incomplète ou intermédiaire de type M1/M2 caractérisée comme suit: IL-10<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>CX3CR1<sup>+</sup> (303). De manière intéressante, ces cellules possèdent la capacité de proliférer *in situ* dans les tumeurs du mésothélium (303). En réponse à CLCF1, les BMDM sécrètent d'importantes quantités d'IL-10 et de TNF- $\alpha$  et n'expriment pas le récepteur CD206, suggérant que CLCF1 pourrait induire un phénotype similaire à une polarisation M3. Malheureusement, notre phénotypage par cytométrie en flux n'incluait pas le marqueur CX3CR1, l'effet de CLCF1 sur l'expression de ce marqueur demeure donc indéterminé. Toutefois, nos analyses de sécrétion démontrent une importante production du ligand de CX3CR1 (CX3CL1) par les BMDM en réponse à la cytokine. Ainsi, il est possible d'émettre l'hypothèse que CLCF1 soit un facteur induisant une polarisation de type intermédiaire M1/M2 semblable à celle observée dans les tumeurs. Par ailleurs, CLCF1 est sécrété par plusieurs lignées de cellules cancéreuses, il serait donc pertinent d'évaluer l'effet de la cytokine sur la reprogrammation des macrophages dans un contexte tumoral.

La polarisation de type M3 est encore un sujet conflictuel dans la littérature, mais il y a un consensus voulant que cette polarisation représente un état transitoire acquis lors d'une reprogrammation de la polarisation des macrophages (changement de polarisation M1 vers M2 ou encore M2 vers M1) (304). Des résultats préliminaires effectués sur des BMDM indiquent que CLCF1 est en mesure de moduler le phénotype des macrophages ayant acquis une polarisation M2, sans toutefois influencer la polarisation M1 (Figure S5, annexe 3). En présence de CLCF1, l'expression de surface de CD206 est fortement diminuée dans les macrophages de type M2. Ces résultats suggèrent que notre cytokine d'intérêt pourrait posséder des fonctions dans la reprogrammation des M2 vers un phénotype abordant des caractéristiques plus pro-inflammatoires. Ce changement de polarisation pourrait être important pour le maintien du potentiel antitumoral des macrophages. Une étude plus approfondie du profil transcriptionnel

complet des macrophages en réponse à CLCF1 serait utile afin de mieux comprendre l'effet de CLCF1 sur la polarisation des macrophages. Afin d'être la plus pertinente possible, cette étude pourrait être effectuée dans un contexte pro-inflammatoire, anti-inflammatoire, et/ou en présence de cellules tumorales.

Comme dans les expériences sur les cultures de cellules de moelles osseuses, nous avons observé que les BMDM sécrètent d'importantes quantités d'IL-1 $\beta$  (50 pg/mL) en réponse à CLCF1. En regard à ces résultats, il serait intéressant de vérifier si la sécrétion d'IL-1 $\beta$  induite par CLCF1 provient de l'activation de l'inflammasome. Le concept d'inflammasome, décrit pour la première fois en 2002 par J Tschopp et ses collègues, consiste en un complexe activateur des caspases stimulant la formation et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  actif (305). Les inflammasomes sont des assemblages multiprotéiques composés de protéines adaptatrices ASC (*apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) et de différents membres de la famille de *NOD-Like Receptor* (NLR). Une fois formés, ces complexes sont en mesure de lier et d'activer les caspases 1 et 5, ces dernières sont alors responsables de cliver la pro-IL-1 et la pro-IL-18 en leur forme active (305, 306). L'activation des inflammasomes est importante pour induire une imposante cascade inflammatoire en réponse aux infections. Toutefois, la suractivation des inflammasomes est directement associée au développement d'inflammation chronique, d'auto-immunité, au développement de cancer ainsi qu'à certaines maladies neurodégénératives (306). Bien que l'on pense que l'hyperthermie décrite chez les patients Crisponi soit due à un dysfonctionnement du système nerveux autonome, les altérations du système immunitaire n'ont pas été étudiées chez ces patients. Le défaut de sécrétion de CLCF1 chez les patients Crisponi pourrait entraîner une accumulation d'actions autocrines par la cytokine dans certaines cellules. Dans cette optique, l'hyperactivation de l'inflammasome médiée par une forte présence de CLCF1 dans les voies de sécrétions pourrait expliquer les épisodes de fièvre stérile observée chez ces patients. *In vitro*, CLCF1 est en mesure de promouvoir la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18 par les BMDM (données non présentées). Des études complémentaires évaluant notamment l'effet de CLCF1 sur l'assemblage des complexes NLRP3-ASC permettraient sans doute d'établir l'importance de CLCF1 dans l'activation de l'inflammasome.

Dans la 2<sup>e</sup> section de cet article, nous avons détecté une augmentation marquée de l'expression de surface du récepteur éboueur SR-A1 sur les BMDM en réponse à CLCF1. Cette augmentation est directement reliée à l'activation des JAK par la cytokine, puisque l'administration du Ruxolitinib a complètement inhibé cet effet. Toutefois, CLCF1 n'a pas induit l'augmentation du récepteur CD36 suggérant un effet biaisé de la cytokine sur les récepteurs éboueurs de classe A plutôt que de classe B. Chez l'humain il existe, 5 membres appartenant à la famille des récepteurs éboueurs de classe A : SR-A1 (SRA1 et SRA1.1), SR-A3, SR-A4 (ou COLEC12), SR-A5 et SR-A6 (SCARA2 ou MARCO) (307-309). Alors que SR-A1 et SR-A6 sont exprimés principalement par les macrophages, les trois autres membres de la famille possèdent quant à eux un profil d'expression beaucoup plus large (placenta, cœur, intestin, etc.) (309). Considérant les différentes fonctions moins classiques des récepteurs éboueurs, il serait intrigant d'évaluer si CLCF1 module l'expression de surface d'autres récepteurs de la famille des SR-A. Notamment, SR-A3 est connu pour avoir des rôles dans la survie cellulaire en réponse aux ROS alors que SR-A5, par sa capacité de lier les bactéries, est considéré comme un facteur important dans la réponse aux pathogènes (310, 311). SR-A4 (aussi appelé COLEC12) quant à lui a été démontré pour être fortement exprimé par les cellules épithéliales du placenta et peut médier la reconnaissance de carbohydrates et de glycoprotéines associés aux neutrophiles (312, 313). À ce jour, aucune donnée n'est disponible dans la littérature concernant les rôles potentiels de CLCF1 dans l'expression de ce type de récepteur ou encore ses fonctions dans la réaction de l'organisme en réponse aux pathogènes. Il s'agit donc d'une perspective de recherche qui permettrait d'obtenir plus d'information sur les rôles de CLCF1 dans la régulation de l'immunité innée.

La forte augmentation de SR-A1 par les macrophages en réponse à notre cytokine d'intérêt a engendré une augmentation de l'influx de LDL-acétylées dans les cellules et favorisé la formation de cellules spumeuses. Ces résultats suggèrent un effet proathérogène de CLCF1 puisque les cellules spumeuses sont des joueurs prépondérants dans la pathogénicité de l'athérosclérose. Il serait maintenant essentiel de confirmer les fonctions de CLCF1 *in vivo* dans un modèle préclinique de cette pathologie. En effet, malgré l'obtention de résultats très significatifs dans notre étude, la totalité de nos expériences sur les cellules spumeuses a été réalisée *in vitro* sur des macrophages différenciés par stimulation au m-CSF dans un modèle



hypersimplifié de la formation des cellules spumeuses. Plusieurs modèles murins d'athérosclérose sont disponibles afin d'étudier la progression et/ou la sévérité de cette maladie; prenant en considération l'interaction de CLCF1 avec les lipoprotéines de très faible densité (article 3, discuté plus en détail dans la prochaine section), je proposerais l'étude de CLCF1 dans un modèle d'athérosclérose ne nécessitant pas l'administration d'une diète riche en gras.

Afin d'établir le potentiel de CLCF1 comme cible potentielle dans l'athérosclérose, nous devons préalablement identifier dans un contexte physiologique quelles cellules en circulation ou dans la plaque d'athérome pourraient être responsables de la sécrétion de CLCF1. L'ADNc de CLCF1 a d'abord été cloné dans les lymphocytes T humains, puis l'ARNm de la cytokine a été détecté dans la rate et les ganglions lymphatiques (83, 95). Plus récemment, CLCF1 a été démontré pour être sécrété par les astrocytes de type 2 (314). Outre ces informations, nos connaissances sont extrêmement fragmentaires concernant le profil d'expression de la cytokine. De même, peu d'informations sont disponibles quant à savoir quel contexte ou quelle stimulation favorise la production de cette cytokine. La génération d'une souris munie d'un gène rapporteur pour CLCF1 nous serait certainement d'une grande aide pour répondre à ces questions. L'inactivation conditionnelle de *CLCF1* dans un modèle murin d'athérosclérose nous permettrait également de mesurer l'impact de la cytokine dans la progression de la pathologie. De plus, il est à noter que dans le 2<sup>e</sup> article nous nous sommes concentrés uniquement sur les effets de CLCF1; or dans un contexte physiologique, CLCF1 forme une cytokine composite avec CRLF1 afin d'être efficacement sécrété. Avant d'entreprendre des expériences impliquant la production de modèles murins dispendieux, il serait intéressant de tester si le complexe CLCF1/CRLF1 favorise l'activation des macrophages et la transition des macrophages en cellules spumeuses de manière similaire à CLCF1. Advenant l'identification de CLCF1 comme cible significative dans l'athérosclérose, le développement d'anticorps monoclonaux neutralisants ou encore la génération d'une trappe à cytokine contre CLCF1 seraient des avenues de stratégies thérapeutiques à considérer.

L'hématopoïèse est un processus fortement impliqué dans la modulation de l'athérosclérose. Tel que décrit dans la section 4.2.2. de l'introduction, les cellules du système immunitaire, principalement les cellules myéloïdes, sont des composantes essentielles à la formation et la

progression des lésions athérosclérotiques. Par ailleurs, chez la souris le cholestérol a été démontré pour induire la prolifération des CSH et favoriser la production de neutrophiles et de monocytes pro-inflammatoires ayant pour effet d'exacerber la progression de la maladie (241, 315). L'expansion des CSH de même que l'induction de la myélopoïèse par CLCF1 pourraient donc être directement impliquées dans les effets athérogènes de la cytokine. En support à cette hypothèse, une analyse plus détaillée des marqueurs d'inflammation a notamment démontré que les cellules myéloïdes formées en réponse à CLCF1 sont Ly6C<sup>+</sup> et CCR2<sup>+</sup>, deux marqueurs pro-inflammatoires favorisant l'internalisation des cellules dans l'endothélium vasculaire. L'importance de l'hématopoïèse dans l'athérosclérose a ressurgi dans les dernières années lorsque le laboratoire de F. Swirski a publié un article expliquant l'implication de l'hématopoïèse extramédullaire dans la production de monocytes pro-infiltrant (316). Cet article démontre en effet que la rate devient, durant l'athérosclérose, une source importante pour la production de monocytes. Au cours de la pathologie, les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques s'accumulent et prolifèrent dans la pulpe rouge de la rate pour ensuite se différencier préférentiellement en monocytes Ly6C<sup>+</sup> en raison de la présence de GM-CSF et d'IL-3 (316). Les résultats obtenus dans les deux premiers articles de cette thèse convergent donc vers la question suivante: dans un contexte d'athérosclérose CLCF1 contribue-t-il à la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques de la rate et à la monocytopoïèse extramédullaire, favorisant ainsi la production d'une quantité encore plus élevée de monocytes pro-inflammatoires?

## **L'interaction de CLCF1 avec les lipides**

Le troisième article de cette thèse porte sur l'identification d'une interaction entre CLCF1 et l'apolipoprotéine E ainsi que l'existence de complexes entre CLCF1 et les lipoprotéines plasmatiques. Cet article démontre que les lipoprotéines de très faibles densités (VLDL) sont en mesure de moduler l'activité biologique de la cytokine. Des expériences effectuées dans un modèle murin de rétinopathie montrent également un fort effet bénéfique de l'injection du CLCF1 ouvrant ainsi la voie à une application thérapeutique potentielle de la cytokine dans le traitement des maladies vasculaires de la rétine.

Une association entre les cytokines pro-inflammatoires et les lipoprotéines dans un contexte de maladie cardiovasculaire est bien établie. Par exemple, un profil lipidique proathérogène chez les patients souffrant de maladies coronariennes est fortement corrélé avec des taux élevés d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  (317, 318). Toutefois, dans la littérature les nombreux liens observés entre ces deux composantes sont indirects et présentés sous forme de cause/conséquence ou de réaction à un stimulus. Dans notre article, nous présentons une vision différente de cette association, nous démontrons en effet que CLCF1 a la capacité d'interagir directement avec les lipoprotéines plasmatiques et que ces dernières peuvent intervenir dans la signalisation médiée par la cytokine.

De manière similaire à CNTF, CLCF1 interagit avec l'apoE un important régulateur du transport du cholestérol. Les expériences de co-immunoprécipitations et d'essais de proximité indiquent que CLCF1 est en mesure de former des complexes avec les trois isoformes d'apoE. De manière intrigante, on dénote dans les expériences d'AlphaLISA effectuées en présence de lipides qu'apoE3 semble interagir plus fortement avec la cytokine que les deux autres isotypes. Tel que décrit dans la section 3.2.3. de l'introduction, l'apoE3 diffère de l'apoE2 et de l'apoE4 par un seul a.a. Cette variation mineure de séquence entraîne toutefois une modification de la structure tridimensionnelle de la protéine. Aussi, en raison de la présence d'un nombre impair de cystéines, l'apoE3 est plus facilement enclin à former des homodimères par la création de ponts disulfures entre les cystéines libres de deux molécules d'apoE. Les résultats d'alphaLISA suggèrent ainsi que CLCF1 pourrait avoir une affinité plus grande pour la structure tridimensionnelle de l'apoE3 ou encore faire partie d'un complexe trimérique constitué de deux molécules d'apoE3 pour une molécule de CLCF1. Le calcul des constantes d'affinités, en utilisant par exemple la technique de résonance de plasmon de surface (SPR) (319, 320), aiderait à établir s'il existe une différence d'affinité significative entre CLCF1 et les trois isoformes d'apoE.

Une affinité plus faible de CLCF1 pour l'apoE2 ou l'apoE4 pourrait influencer l'activité biologique de la cytokine. Notamment, dans le 3<sup>e</sup> article nous avons comparé la capacité du complexe CLCF1/apoE3 à induire la phosphorylation de STAT3 par rapport à CLCF1 seul. La présence d'apoE3 semble influencer l'activation du récepteur au CNTF. Bien que faible, cette modulation est très reproductible et pourrait certainement se traduire au niveau physiologique

par une différence sur le long terme de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT. Une affinité plus faible des complexes CLCF1/apoE2 ou CLCF1/apoE4 pourrait ne pas être suffisante pour engendrer l'augmentation de signalisation observée avec le complexe CLCF1/apoE3. ApoE2 et apoE4 sont tous deux des facteurs de risques dans le développement de plusieurs pathologies, il serait donc très pertinent d'étudier plus en détail l'effet d'apoE2 et d'apoE4 sur la signalisation de CLCF1.

Nous nous sommes limités à l'étude de l'effet d'apoE sur la phosphorylation de STAT3 induite par CLCF1, les expériences effectuées à ce jour ne nous procurent pas d'information sur l'effet de CLCF1/apoe3 sur la phosphorylation des autres STAT ou encore sur l'activation d'autres voies de signalisation. En circulation, les taux d'apoE sont beaucoup plus élevés que ceux de CLCF1. Ainsi, en raison du rapport de masse il est fortement envisageable que l'entièreté de CLCF1 se retrouve complexée à l'apoE ou aux lipoprotéines. Par ailleurs, dans les expériences de fractionnement de sérum par FPLC, nous n'avons pas été en mesure de détecter la cytokine dans les fractions représentant les protéines libres. La signalisation induite par les complexes CLCF1/apoE est donc une question de forte relevance puisqu'elle représente probablement la signalisation réellement induite par le CLCF1 sécrété dans le milieu extracellulaire *in vivo*.

L'interaction de CLCF1 avec les VLDL, contrairement à celle avec apoE3, diminue voire même inhibe la phosphorylation de STAT3 dans les cellules exprimant CNTFR. Nous avons émis en hypothèse que l'encombrement stérique lié à la présence de VLDL restreint la dimérisation des chaînes signalisatrices LIFR $\beta$  et gp130. Selon cette hypothèse, la présence de VLDL engendrerait la diminution de toutes les voies de signalisation impliquant la phosphorylation des chaînes signalisatrices. Une étude plus détaillée de l'activation des autres voies de signalisation induites par CLCF1 en présence ou en absence de VLDL sera nécessaire afin de confirmer cette hypothèse mécanistique. Il serait également envisageable que le complexe CLCF1/VLDL induise une signalisation biaisée du récepteur.

Dans cet article nous nous sommes concentrés sur le récepteur canonique de CLCF1, le CNTFR. Il serait intéressant d'évaluer si les complexes CLCF1/apoE, CLCF1/VLDL ou

CLCF1/LDL lient ou activent la Sortiline de manière semblable à CLCF1. L'existence de complexes CLCF1/lipoprotéines pourrait également conférer à la cytokine une affinité pour d'autres chaînes alpha de récepteur, par exemple est-ce qu'un récepteur trimérique composé des chaînes VLDLR, LIFR $\beta$  et gp130 pourrait constituer un récepteur pour le complexe CLCF1/VLDL?

L'observation d'une interaction entre les lipoprotéines plasmatiques et notre cytokine d'intérêt soulève des interrogations quant à la finalité de ces complexes. Par exemple, est-ce que la formation de tels complexes pourrait permettre le ciblage ou le transport de CLCF1 vers des tissus ou des cellules exprimant des récepteurs aux lipoprotéines? Par exemple, les cellules endothéliales formant la barrière hématoencéphalique (BHE) expriment à leur surface des LDLR. Ces derniers ont été démontrés pour favoriser le transport de certaines molécules à travers la BHE par transcytose (321, 322). Il serait envisageable que CLCF1, par son interaction avec les lipoprotéines plasmatiques puisse circuler à travers la BHE et remplir des fonctions neurotrophiques.

Les cytokines de la famille de l'IL-6 sont connues pour avoir des demi-vies très courtes de l'ordre de quelques minutes (323, 324). Il a été montré que la liaison des micro-ARN avec les HDL augmente significativement la stabilité de ces derniers (325). Ainsi, serait-il possible que la liaison de CLCF1 avec les lipides favorise la stabilité de la cytokine et diminue sa dégradation? Prenant en considération la grande différence d'activité biologique entre les complexes CLCF1/LDL et CLCF1/VLDL, une des questions importantes découlant de ce projet de recherche est certainement d'évaluer si les fonctions métaboliques, immunomodulatrices et neurotrophiques de la cytokine peuvent être directement influencées par le profil cholestérolémique. Par exemple, est-ce qu'un patient hypercholestérolémique présentant des niveaux très élevés de VLDL produit un CLCF1 moins actif qu'un patient dont les niveaux de HDL sont plus élevés?

Étonnamment, en absence d'apoE nous avons observé que CLCF1 maintient son interaction avec les lipoprotéines. Ces résultats nous ont menés à tester si CLCF1 était en mesure de lier directement les lipides. Nous avons réalisé quelques expériences préliminaires en utilisant

notamment des lipides immobilisés sur des membranes hydrophobiques. Nos résultats suggèrent que CLCF1 de même que CLCF1/CRLF1 ne lient pas le cholestérol ou les triglycérides. Toutefois, les résultats indiquent une liaison entre CLCF1 et la famille des phosphatidylinositol phosphate (PIP) (Figure S6, Annexe 3). Des analyses de phospholipidomique effectuées sur des lipoprotéines plasmatiques ont révélé la présence de phosphatidylinositol (PI) dans tous les types de lipoprotéines (326). À la suite de cet article, un second article démontrant la présence de phosphatidylinositol triphosphate à la surface des VLDL a été publié dans le journal *Biochemical and Biophysical Research Communication* (327). Ces résultats suggèrent que la liaison de CLCF1 aux lipoprotéines pourrait provenir d'une interaction avec les PIP. Outre la liaison aux phospholipides, une hypothèse alternative serait que CLCF1 lie d'autres types d'apolipoprotéines tels que l'apoB ou encore l'apoC.

Dans la dernière section de cet article, nous démontrons une grande efficacité de CLCF1 dans la réduction de la néovascularisation pathologique dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène. Les effets de CLCF1 dans ce modèle suggèrent des fonctions similaires entre notre cytokine d'intérêt et son homologue le CNTF. CNTF est actuellement testé en clinique comme traitement dans diverses rétinopathies. De manière plus inattendue, l'injection de VLDL a également mené à une forte réduction de la pathologie. En raison des fonctions intrinsèques de VLDL, il a été impossible de quantifier l'impact de VLDL sur l'activité biologique de CLCF1 *in vivo*. Afin de mieux caractériser les fonctions des complexes CLCF1/VLDL *in vivo*, il serait pertinent de comparer les effets de CLCF1 aux effets de CLCF1/VLDL dans un modèle de pathologie où les lipoprotéines ont peu d'activités propres ou montrent des effets distincts de ceux de CLCF1.

## **Perspectives de recherches élargies**

Les chapitres précédents abordent des perspectives de recherches en liens étroits avec les trois articles présentés. La section suivante abordera des concepts un peu plus larges concernant des activités biologiques, des récepteurs ou des partenaires d'interactions potentiels de CLCF1.

L'étude des fonctions biologiques de cette cytokine sont limitées par trois contraintes principales : premièrement il y a une lacune de modèles animaux spécifiques pour étudier le

CLCF1, deuxièmement les récepteurs responsables des effets immunitaires de la cytokine sont encore inconnus et troisièmement les anticorps commerciaux disponibles contre CLCF1 sont peu spécifiques et exhibent une faible affinité pour la cytokine.

### **Modèles murins pour l'étude de CLCF1**

Afin de pallier au manque de souris déficientes pour *CLCF1*, nous avons lors de mes études doctorales tenté d'étudier les fonctions immunitaires de CLCF1 en surexprimant la cytokine ou en administrant la protéine recombinante chez les souris. Cette stratégie nous permet certainement d'acquérir des informations originales sur les activités de la cytokine. Toutefois, cette approche ne prend pas en compte les concentrations physiologiques de CLCF1 ni les partenaires d'interaction avec lesquels CLCF1 peut être sécrété des cellules. Pour ces raisons, afin de déterminer le potentiel comme cible thérapeutique d'une cytokine dans une pathologie, il est usuel d'étudier la progression de ces pathologies dans un modèle animal déficient pour la cytokine d'intérêt ou en présence d'anticorps neutralisant. L'inactivation homozygote de CLCF1 chez les souris mène au décès périnatal en raison d'un défaut dans le développement du système nerveux sympathique. Les souris KO pour CLCF1 sont donc peu utiles. Les fonctions immunitaires de la cytokine pourraient être étudiées de manière plus élargie à l'aide d'un modèle de souris KO inducible via la création d'une souris CLCF1 floxée. La production d'un tel modèle nous permettrait d'une part de dépléter CLCF1 spécifiquement dans le système immunitaire (croisement avec une souris dont l'expression de la Cre-Recombinase dépend du promoteur de CD45). De cette façon, il serait possible d'étudier les fonctions de CLCF1 dans le développement et la régulation du système immunitaire sans affecter ces fonctions neurotrophiques. D'autre part, la production d'une souris CLCF1 floxée nous permettrait d'évaluer les rôles immunitaires et neuronaux de la cytokine post-développement, c'est-à-dire les fonctions biologiques de CLCF1 à l'extérieur de l'embryogenèse. Pour se faire, il serait envisageable de produire une souris KO conditionnel en croisant les souris floxées avec des souris transgéniques pour la CRE-ERT2 inducible par le tamoxifène. Ainsi, il serait possible d'induire la déplétion de CLCF1 à différents âges et comparer les conséquences d'un manque de CLCF1 en jeune âge, à l'adolescence ou à l'âge adulte. Cette information serait très intéressante, puisque chez les patients CISS et Crisponi les épisodes de fièvre stériles et les infections récurrentes ont été décrites uniquement chez les jeunes enfants et non chez les adultes,

inversement les problèmes de sudations se développent plus tardivement chez ces patients (107).

### **Activités biologiques de CLCF1 dans la neuro-inflammation**

Les souris KO CLCF1 inductible au tamoxifène pourraient également être un outil très utile pour évaluer si CLCF1 possède des rôles non redondants dans la neuro-inflammation. Les phénotypes des patients CISS et Crisponi suggèrent une interaction entre CLCF1 ou CLCF1/CRLF1 et les neurones nociceptifs. Les patients souffrent de graves problèmes de thermorégulation, un des patients CISS exhibe une sensibilité très diminuée à la douleur et certaines mutations de CRLF1 sont associées à l'achalasie (116). De plus, CLCF1 est un facteur produit par les astrocytes de type 2 en réponse à différents dommages, CLCF1 est particulièrement sécrété par les astrocytes dans un contexte de blessure liée à l'ischémie (314). Les astrocytes sont des acteurs importants dans la modulation de la neuro-inflammation, la sécrétion de CLCF1 par ces cellules pourrait avoir une influence à la fois sur l'activation des nocicepteurs et des cellules immunitaires. Dans un modèle de lésions de moelle épinière effectuées chez le rat, des analyses de protéomiques ont détecté CLCF1 dans le milieu conditionné provenant des segments de moelle épinière lésée 3 jours après la chirurgie, la cytokine n'a pas été observée dans les segments caudaux ou rostraux utilisés comme contrôle (328). Ceci suggère que la cytokine est produite lors de la phase d'inflammation aiguë suivant une blessure neurologique. Les mécanismes neuro-inflammatoires dans lesquels CLCF1 est impliqué restent toutefois à être étudiés. CLCF1 pourrait favoriser le recrutement des cellules immunes, influencer la polarisation de la microglie ou encore favoriser la croissance axonale ou la myélinisation. Bien que cette étude soit effectuée chez le rat, des modèles chirurgicaux de lésions de moelle épinière ont été développés chez la souris dans les dernières décennies afin de pouvoir étudier ce type de blessures dans les souris KO et KO conditionnels (329). Ainsi, une perspective intéressante serait de comparer l'inflammation associée à une lésion de moelle osseuse dans des souris déficientes en CLCF1 et des souris sauvages.

### **Identifications des récepteurs secondaires de CLCF1**

Outre le manque de modèles murins pour étudier les effets de CLCF1, une autre lacune est le fait que le ou les seconds récepteurs de CLCF1 sur les cellules immunes ne sont pas identifiés.



CLCF1 a d'abord été découvert comme un facteur de stimulation des lymphocytes B, or les cellules B n'expriment pas la chaîne CNTFR $\alpha$ . Cela implique l'existence d'un deuxième récepteur pour CLCF1. Le laboratoire de Petersen en 2010 a démontré par SPR une affinité de CLCF1 pour la sortiline (75). Dans cet article, seule l'affinité entre les deux protéines a été mesurée. Nous avons démontré que les chaînes sortiline, LIFR $\beta$  et gp130 forment un récepteur trimérique actif capable d'induire la phosphorylation de STAT3 en réponse à CLCF1 (Figure S7, Annexe 3). Les splénocytes provenant de souris déficientes en Sortiline maintiennent toutefois une réponse au CLCF1. Ainsi, il existe probablement d'autres récepteurs expliquant les activités de la cytokine.

La liaison de CLCF1 avec la sortiline pourrait toutefois être impliquée dans les processus de sécrétion de la cytokine. La sortiline est un récepteur dont une des fonctions principales est de réguler le trafic des protéines (330). Un article par C. Campbell démontre que la sortiline favorise l'accumulation de la protéine Sonic Hedgehog dans le Golgi et inhibe sa sécrétion (331). Il serait envisageable que CLCF1 soit retenu dans le Golgi ou les voies de sécrétion de manière similaire en raison de son interaction avec la sortiline. Les travaux du laboratoire de V. Savin ont d'ailleurs récemment démontré que CLCF1 et le complexe CLCF1/CLRF1 interagissent différemment avec la sortiline (119). Cette observation pourrait expliquer la différence de sécrétion entre le complexe CRLF1/CLCF1 et la cytokine seule. La déplétion de la sortiline dans des transfectants exprimant CLCF1, par l'approche CRISPR-Cas9 ou ShRNA par exemple, pourrait nous donner une première indication de l'implication de ce récepteur dans la rétention de CLCF1.

L'identification d'autres récepteurs de CLCF1 sera nécessaire afin de mieux comprendre la biochimie de CLCF1 et de mieux identifier les cibles immunes de cette cytokine. Récemment, un article publié par une équipe allemande a démontré par la production de récepteurs chimériques synthétiques que la grande majorité des combinaisons aléatoires des segments intracellulaires des chaînes réceptrices de la famille IL-6/IL-12 forme des récepteurs actifs capables d'induire une signalisation. L'éventail des récepteurs dimériques ou trimériques potentiels pour CLCF1 s'avère donc très large. Il est aussi tout à fait possible que CLCF1 active un récepteur n'impliquant pas les chaînes réceptrices communes à la famille de l'IL-6. Dans les

dernières années, nous avons tenté d'identifier de nouveaux récepteurs de CLCF1 en adoptant une stratégie dite rationnelle, c'est-à-dire que nous avons effectué des essais de liaison avec les principaux candidats de chaînes réceptrices partageant une homologie de séquence avec CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  et gp130. Malheureusement, cette approche n'a pas mené jusqu'à présent à l'identification d'un nouveau récepteur actif pour CLCF1. L'utilisation d'une approche de criblage moléculaire à large spectre serait probablement une stratégie plus efficace pour identifier de nouvelles chaînes réceptrices pour CLCF1. Plusieurs technologies ont été développées dans les dernières années afin d'étudier de manière non biaisée les interactions protéines-protéines, parmi celles-ci on retrouve différentes stratégies de capture de récepteurs basées sur le ligand (*ligand-based receptor capture technology*). Par exemple, la méthode de BioID du laboratoire de K.J. Roux, une technologie basée sur la biotinylation des partenaires d'interactions via une biotine ligase mutée couplée au ligand, a suscité beaucoup d'intérêt dans les laboratoires de recherche afin d'identifier de nouveaux réseaux d'interaction protéines-protéines (332). Le couplage de BioID avec CLCF1 pourrait être une stratégie envisageable afin d'identifier les récepteurs de surfaces interagissant avec la protéine. Toutefois, l'activité enzymatique de BioID est optimale dans le cytoplasme des cellules, ainsi des expériences nécessitant l'utilisation d'un BioID-CLCF1 en extracellulaire demandera certainement une série d'optimisation de la technique. Une alternative intéressante serait d'utiliser la technique LRC-TriCEPS détaillée dans Nature Biotechnologies en 2012 par le laboratoire de B. Wollscheid (333, 334). TriCEPS est un réactif comprenant trois segments aux fonctions distinctes, une des extrémités de ce composé est un groupement NHS permettant le couplage du ligand d'intérêt au TriCEPS (couplage NHS-Lysine), la deuxième extrémité est constituée d'un polypeptide hydrazide pouvant former un lien covalent avec les récepteurs glycosylés présents à la surface des cellules et finalement TriCEPs contient une troisième branche biotine pour fin d'enrichissement avant analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) (333). Ce réactif nouvellement disponible pourrait être pertinent afin de déterminer par quels récepteurs CLCF1 interagit avec les CSH, les macrophages et les lymphocytes B.

L'évolution des différentes technologies de capture de récepteurs basées sur les ligands facilitera probablement l'identification des différents récepteurs de CLCF1. Il s'avère toutefois important de prendre en considération que le manque de succès obtenu jusqu'à présent avec la stratégie

rationnelle pourrait être dû à des facteurs indépendants d'un biais de sélection. Notre cytokine d'intérêt possède une forte tendance à former des complexes dimériques avec d'autres protéines, CLCF1 est sécrété sous forme de cytokine composite avec CRLF1 ou EBI3 (données non présentées), il interagit aussi avec les apolipoprotéines, les lipoprotéines plasmatiques ainsi que d'autres sous-unités de la famille de l'IL-6/IL-12. Les différents partenaires d'interaction de CLCF1 pourraient expliquer l'existence de nombreux récepteurs pour la cytokine : les cytokines composites impliquant CLCF1 pourraient avoir des affinités pour des chaînes réceptrices différentes de celles de CLCF1 seule. À ce jour, nous avons utilisé la méthode rationnelle de criblage de récepteurs uniquement avec la protéine recombinante CLCF1.

### **Fonctions de CLCF1 dans la polarisation des lymphocytes T effectrices**

De manière intéressante, l'ajout de CLCF1 dans la culture des cellules de moelle osseuse a provoqué de manière dose-dépendante la sécrétion de nombreux médiateurs solubles. Par exemple, CLCF1 a induit la production d'une grande quantité d'IL-9 (Article 1, Figure 2). La production d'IL-9 par CLCF1 a aussi été reproduite dans des cultures de macrophages dérivés de la moelle osseuse (BMDM) (Article 2, Figure 2). L'IL-9 est une cytokine multifonctionnelle principalement sécrétée par les lymphocytes T activés et les mastocytes. Ces observations indiquent que CLCF1 pourrait être une cytokine favorisant la production de cellules Th9. Les Lymphocytes T peuvent être polarisés vers différents phénotypes identifiés selon leurs caractéristiques fonctionnelles (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et Treg) (335). Les Th9 sont définies comme des lymphocytes Th2 reprogrammés sécrétant des quantités abondantes d'IL-9 (336). L'IL-9 est une cytokine de la famille de l'IL-2 principalement produit dans un contexte inflammatoire de type Th2 (337). Cette cytokine a initialement été identifiée comme un facteur de croissance des lymphocytes T (338). Dans les poumons, l'IL-9 favorise également la prolifération de mastocytes et des éosinophiles (339). Une fonction importante de l'IL-9 est l'activation des cellules T régulatrices, l'IL-9 est en effet requis pour les fonctions suppressives des Treg (340). En produisant de cette cytokine, les Th9 sont impliquées dans la réponse aux infections parasitaires, exhibent une imposante capacité antitumorale et exacerbent l'inflammation liée aux allergies et à l'asthme (341). Malgré l'émergence des études reliées aux rôles de ces cellules, les mécanismes contrôlant la différenciation et la régulation de ces lymphocytes sont encore peu définis. Le TGF $\beta$ , l'IL-4, l'activation de STAT6 et de GATA3

semblent favoriser la différenciation des Th9 alors que l'IL-23 et l'IFN $\gamma$  ont été suggérés comme facteurs inhibiteurs de cette polarisation (336, 342-344). Comme les macrophages activés par CLCF1, les Th9 sécrètent à la fois de l'IL-9 et de l'IL-10 (336). À ma connaissance, aucune donnée n'est disponible dans la littérature quant à l'effet de CLCF1 sur ces cellules, il serait donc très intéressant d'étudier si CLCF1 est en mesure d'induire la différenciation des cellules effectrices T CD4 vers un type Th9.

## V. Conclusion

Les résultats inclus dans cette thèse ont permis d'élargir nos connaissances sur les fonctions biologiques de la cytokine CLCF1. Ce travail présente notamment de nouvelles activités biologiques de CLCF1 dans la régulation du système immunitaire et démontre l'existence de complexes entre cette cytokine et les lipoprotéines plasmatiques.

Les deux premiers articles de cette thèse soulèvent un rôle jusqu'alors non identifié de CLCF1 dans la production et l'activation des cellules myéloïdes : dans la littérature, CLCF1 est considéré comme un facteur neurotrophique ainsi qu'un facteur de stimulation des lymphocytes B. Nos résultats ont mené à l'identification de nouvelles fonctions hématopoïétiques incluant un important biais vers la myélopoïèse. Subséquemment, nous avons observé la capacité de CLCF1 à activer la voie de signalisation JAK/STAT dans les macrophages et démontré *in vitro* la capacité de CLCF1 à favoriser la transition des macrophages vers les cellules spumeuses. Ces résultats suggèrent ainsi que CLCF1 est une cible potentielle à étudier dans des modèles précliniques d'athérosclérose.

Nos observations sur les rôles de CLCF1 dans l'activation des cellules myéloïdes ouvrent la voie à de nombreuses perspectives de recherche future : la lignée myéloïde représente une population très hétérogène de cellules allant de la microglie jusqu'aux mégacaryocytes. Les fonctions biologiques de la cytokine dans ces différents types cellulaires demeurent encore inconnues. De nombreuses études plus détaillées seront nécessaires afin de déterminer des caractéristiques fonctionnelles précises de CLCF1 envers chacun des types cellulaires issus des précurseurs myéloïdes. Une meilleure compréhension des mécanismes d'actions hématopoïétiques de la cytokine pourrait également aider à expliquer les symptômes observés chez les patients CISS et Crisponi.

Le troisième article présente l'identification d'un complexe entre CLCF1 et les trois isoformes communes de l'apolipoprotéine E, suggérant ainsi l'existence d'une nouvelle cytokine

composite apoE/CLCF1. Cet article démontre également l'impressionnante capacité des lipoprotéines plasmatiques de très faible densité à moduler l'activité biologique de CLCF1. Il sera intéressant de tester si d'autres cytokines sont modulées par les lipoprotéines et si le profil métabolique peut réguler ces médiateurs solubles du système immunitaire.

Notre étude conduit à une meilleure connaissance d'une cytokine sous-étudiée dont la biochimie et les cibles immunitaires sont encore peu comprises. Nous espérons qu'elle contribuera à susciter l'intérêt et l'étude de cette molécule.

## VI. Bibliographie

1. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 1701 p.
2. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(12):773-89.
3. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(18):6934-8.
4. Hinds MG, Maurer T, Zhang JG, Nicola NA, Norton RS. Solution structure of leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13738-45.
5. Somers W, Stahl M, Seehra JS. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J*. 1997;16(5):989-97.
6. de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*. 1992;255(5042):306-12.
7. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998;334 ( Pt 2):297-314.
8. Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J*. 2000;19(11):2399-411.
9. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*. 2003;300(5628):2101-4.
10. Huisling MO, Kruiswijk CP, Flik G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J Endocrinol*. 2006;189(1):1-25.
11. Schaper F, Rose-John S. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):475-87.
12. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*. 1993;23(2):473-80.
13. Johnstone CN, Chand A, Putoczki TL, Ernst M. Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):489-98.
14. Lokau J, Nitz R, Agthe M, Monhasery N, Aparicio-Siegmund S, Schumacher N, et al. Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep*. 2016;14(7):1761-73.
15. Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, et al. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*. 1993;260(5115):1805-8.
16. Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science*. 1993;259(5102):1736-9.
17. Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF. Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015;26(5):507-15.

18. Robledo O, Fourcin M, Chevalier S, Guillet C, Auguste P, Pouplard-Barthelaix A, et al. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem.* 1997;272(8):4855-63.
19. Usacheva A, Sandoval R, Domanski P, Kotenko SV, Nelms K, Goldsmith MA, et al. Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48220-6.
20. Ernst M, Putoczki TL. Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers. *Clin Cancer Res.* 2014;20(22):5579-88.
21. Lai CF, Ripperger J, Morella KK, Wang Y, Gearing DP, Fey GH, et al. Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. *J Biol Chem.* 1995;270(25):14847-50.
22. Hemmann U, Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Kurapkat G, Grotzinger J, et al. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem.* 1996;271(22):12999-3007.
23. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, et al. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(1):407-11.
24. Shahin T, Aschenbrenner D, Cagdas D, Kostel Bal S, Dominguez Conde C, Garncarz W, et al. Selective loss of function variants in IL6ST cause Hyper-IgE Syndrome with distinct impairments of T cell phenotype and function. *Haematologica.* 2018.
25. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):533-44.
26. Dagoneau N, Scheffer D, Huber C, Al-Gazali LI, Di Rocco M, Godard A, et al. Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;74(2):298-305.
27. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA, et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development.* 1995;121(5):1283-99.
28. Ghoreschi K, Laurence A, O'Shea JJ. Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev.* 2009;228(1):273-87.
29. Villarino AV, Kanno Y, Ferdinand JR, O'Shea JJ. Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *J Immunol.* 2015;194(1):21-7.
30. Egwuagu CE. STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2009;47(3):149-56.
31. Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer.* 2016;138(11):2570-8.
32. Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, et al. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(22):6659-66.
33. Holland SM, DeLeo FR, Elloumi HZ, Hsu AP, Uzel G, Brodsky N, et al. STAT3 mutations in the hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1608-19.
34. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell.* 1996;84(3):431-42.



35. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002;285(1-2):1-24.
36. Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Vistica BP, Chen J, Guo Y, et al. Cell proliferation and STAT6 pathways are negatively regulated in T cells by STAT1 and suppressors of cytokine signaling. *J Immunol*. 2004;173(2):737-46.
37. Azam M, Lee C, Strehlow I, Schindler C. Functionally distinct isoforms of STAT5 are generated by protein processing. *Immunity*. 1997;6(6):691-701.
38. Azam M, Erdjument-Bromage H, Kreider BL, Xia M, Quelle F, Basu R, et al. Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *EMBO J*. 1995;14(7):1402-11.
39. Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N. Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(4):395-403.
40. Dance M, Montagner A, Salles JP, Yart A, Raynal P. The molecular functions of Shp2 in the Ras/Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) pathway. *Cell Signal*. 2008;20(3):453-9.
41. Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(9):1619-33.
42. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20.
43. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(8):627-44.
44. Manning BD, Toker A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*. 2017;169(3):381-405.
45. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986;324(6092):73-6.
46. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.
47. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*. 1993;54:1-78.
48. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*. 1992;4(2):96-100.
49. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(3):85-97.
50. Jones MR, Quinton LJ, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J Infect Dis*. 2006;193(3):360-9.
51. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):713-21.
52. Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, et al. Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells. *J Immunol*. 2007;179(4):2041-5.

53. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990;265(3):621-36.
54. Helle M, Brakenhoff JP, De Groot ER, Aarden LA. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. *Eur J Immunol.* 1988;18(6):957-9.
55. LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. Role of interleukin 6 in fever in rats. *Am J Physiol.* 1990;258(3 Pt 2):R798-803.
56. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol.* 1997;15(2):142-5.
57. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017;77(17):1865-79.
58. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, for the treatment of autoimmune diseases. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3699-709.
59. Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, et al. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001;268(1):160-7.
60. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ, et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* 1987;6(13):3995-4002.
61. Robinson RC, Grey LM, Staunton D, Vankelecom H, Vernallis AB, Moreau JF, et al. The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell.* 1994;77(7):1101-16.
62. Boulanger MJ, Bankovich AJ, Kortemme T, Baker D, Garcia KC. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell.* 2003;12(3):577-89.
63. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-76.
64. Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Kontgen F, et al. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature.* 1992;359(6390):76-9.
65. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(2):582-92.
66. Pasquin S, Sharma M, Gauchat JF. Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism. *Cytokine.* 2016;82:122-4.
67. Metcalfe SM. LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic. *Genes Immun.* 2011;12(3):157-68.
68. Weber MA, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Quesniaux V, Poli V, Stewart CL, et al. Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response. *Lab Invest.* 2005;85(2):276-84.
69. Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood.* 2014;124(5):700-9.
70. Gunawardana DH, Bassler RL, Davis ID, Cebon J, Mitchell P, Underhill C, et al. A phase I study of recombinant human leukemia inhibitory factor in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(6):2056-65.
71. Lass A, Weiser W, Munafo A, Loumaye E. Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertil Steril.* 2001;76(6):1091-6.

72. van den Bent MJ. Prevention of chemotherapy-induced neuropathy: leukemia inhibitory factor. *Clin Cancer Res.* 2005;11(5):1691-3.
73. Skaper SD, Selak I, Manthorpe M, Varon S. Chemically defined requirements for the survival of cultured 8-day chick embryo ciliary ganglion neurons. *Brain Res.* 1984;302(2):281-90.
74. Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, et al. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature.* 1989;342(6252):920-3.
75. Larsen JV, Hansen M, Moller B, Madsen P, Scheller J, Nielsen M, et al. Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer. *Mol Cell Biol.* 2010;30(17):4175-87.
76. Emerich DF, Lindner MD, Winn SR, Chen EY, Frydel BR, Kordower JH. Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci.* 1996;16(16):5168-81.
77. Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther.* 2004;15(10):968-75.
78. Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther.* 2000;11(12):1723-9.
79. Barres BA, Burne JF, Holtmann B, Thoenen H, Sendtner M, Raff MC. Ciliary Neurotrophic Factor Enhances the Rate of Oligodendrocyte Generation. *Mol Cell Neurosci.* 1996;8(2/3):146-56.
80. Kuhlmann T, Remington L, Cognet I, Bourbonniere L, Zehntner S, Guilhot F, et al. Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2006;169(2):584-98.
81. Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA. CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(2):136-51.
82. Emerich DF, Thanos CG. NT-501: an ophthalmic implant of polymer-encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells. *Curr Opin Mol Ther.* 2008;10(5):506-15.
83. Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, et al. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11458-63.
84. Shi Y, Wang W, Yourey PA, Gohari S, Zukauskas D, Zhang J, et al. Computational EST database analysis identifies a novel member of the neuropoietic cytokine family. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;262(1):132-8.
85. Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, et al. CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci.* 2000;3(9):867-72.
86. Plun-Favreau H, Elson G, Chabbert M, Froger J, deLapeyriere O, Lelievre E, et al. The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine. *EMBO J.* 2001;20(7):1692-703.

87. Vlotides G, Zitzmann K, Stalla GK, Auernhammer CJ. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(5):325-36.
88. Rousseau F, Chevalier S, Guillet C, Ravon E, Diveu C, Froger J, et al. Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J Biol Chem.* 2008;283(44):30341-50.
89. Lelievre E, Plun-Favreau H, Chevalier S, Froger J, Guillet C, Elson GC, et al. Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22476-84.
90. Cognet I, Guilhot F, Gabriac M, Chevalier S, Chouikh Y, Herman-Bert A, et al. Cardiotrophin-like cytokine labelling using Bir A biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells. *J Immunol Methods.* 2005;301(1-2):53-65.
91. Larsen JV, Kristensen AM, Pallesen LT, Bauer J, Vaegter CB, Nielsen MS, et al. Cytokine-Like Factor 1, an Essential Facilitator of Cardiotrophin-Like Cytokine:Ciliary Neurotrophic Factor Receptor alpha Signaling and sorLA-Mediated Turnover. *Mol Cell Biol.* 2016;36(8):1272-86.
92. Larsen JV, Petersen CM. SorLA and CLC:CLF-1-dependent Downregulation of CNTFRalpha as Demonstrated by Western Blotting, Inhibition of Lysosomal Enzymes, and Immunocytochemistry. *J Vis Exp.* 2017(119).
93. Zou X, Bolon B, Pretorius JK, Kurahara C, McCabe J, Christiansen KA, et al. Neonatal death in mice lacking cardiotrophin-like cytokine is associated with multifocal neuronal hypoplasia. *Vet Pathol.* 2009;46(3):514-9.
94. Sims NA. Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) and neuropoietin (NP) signalling and their roles in development, adulthood, cancer and degenerative disorders. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):517-22.
95. Senaldi G, Stolina M, Guo J, Faggioni R, McCabe S, Kaufman SA, et al. Regulatory effects of novel neurotrophin-1/b cell-stimulating factor-3 (cardiotrophin-like cytokine) on B cell function. *J Immunol.* 2002;168(11):5690-8.
96. Forger NG, Prevette D, deLapeyriere O, de Bovis B, Wang S, Bartlett P, et al. Cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor 1 is an essential trophic factor for lumbar and facial motoneurons in vivo. *J Neurosci.* 2003;23(26):8854-8.
97. Uemura A, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Nakashima K, Taga T. Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine.* 2002;18(1):1-7.
98. Schuettauf F, Zurakowski D, Quinto K, Varde MA, Besch D, Laties A, et al. Neuroprotective effects of cardiotrophin-like cytokine on retinal ganglion cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(10):1036-42.
99. Alexander WS, Rakar S, Robb L, Farley A, Willson TA, Zhang JG, et al. Suckling defect in mice lacking the soluble haemopoietin receptor NR6. *Curr Biol.* 1999;9(11):605-8.
100. DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, et al. Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell.* 1995;83(2):313-22.
101. Kraves S, Weitz CJ. A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):212-9.

102. McGregor NE, Poulton IJ, Walker EC, Pompolo S, Quinn JM, Martin TJ, et al. Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(3):261-70.
103. Ge JR, Xie LH, Chen J, Li SQ, Xu HJ, Lai YL, et al. Liuwei Dihuang Pill () Treats Postmenopausal Osteoporosis with Shen (Kidney) Yin Deficiency via Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signal Pathway by Up-regulating Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1 Expression. *Chin J Integr Med.* 2018;24(6):415-22.
104. Vicent S, Sayles LC, Vaka D, Khatri P, Gevaert O, Chen R, et al. Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo. *Cancer Res.* 2012;72(22):5744-56.
105. Kass DJ, Yu G, Loh KS, Savir A, Borczuk A, Kahloon R, et al. Cytokine-like factor 1 gene expression is enriched in idiopathic pulmonary fibrosis and drives the accumulation of CD4+ T cells in murine lungs: evidence for an antifibrotic role in bleomycin injury. *Am J Pathol.* 2012;180(5):1963-78.
106. Tormo AJ, Letellier MC, Lissilaa R, Batraverse LA, Sharma M, Ferlin W, et al. The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities. *Cytokine.* 2012;60(3):653-60.
107. Hahn AF, Boman H. Cold-Induced Sweating Syndrome Including Crisponi Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews((R))*. Seattle (WA)1993.
108. Rousseau F, Gauchat JF, McLeod JG, Chevalier S, Guillet C, Guilhot F, et al. Inactivation of cardiotrophin-like cytokine, a second ligand for ciliary neurotrophic factor receptor, leads to cold-induced sweating syndrome in a patient. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(26):10068-73.
109. Dagoneau N, Bellais S, Blanchet P, Sarda P, Al-Gazali LI, Di Rocco M, et al. Mutations in cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1) account for both Crisponi and cold-induced sweating syndromes. *Am J Hum Genet.* 2007;80(5):966-70.
110. Hahn AF, Waaler PE, Kvistad PH, Bamforth JS, Miles JH, McLeod JG, et al. Cold-induced sweating syndrome: CISS1 and CISS2: manifestations from infancy to adulthood. Four new cases. *J Neurol Sci.* 2010;293(1-2):68-75.
111. Nannenber EA, Bijlmer R, Van Geel BM, Hennekam RC. Neonatal paroxysmal trismus and camptodactyly: the Crisponi syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005;133A(1):90-2.
112. Della Marca G, Barone G, Vollono C, Dittoni S, Vasta I, Timpani G, et al. Central apneas in a case of Crisponi syndrome. *Sleep Med.* 2008;9(6):703-4.
113. Aljabari S, Howard E, Bell T, Vasylyeva TL. Cold induced sweating syndrome with urinary system anomaly association. *Case Rep Pediatr.* 2013;2013:173890.
114. Agresta A, Fasciani R, Padua L, Petroni S, La Torraca I, Dickmann A, et al. Corneal alterations in Crisponi/CISS1 syndrome: A slit-lamp biomicroscopy and in vivo confocal microscopy corneal report. *Ophthalmic Genet.* 2017;38(1):83-7.
115. Tuysuz B, Kasapcopur O, Yalcinkaya C, Isik Hasiloglu Z, Knappskog PM, Boman H. Multiple small hyperintense lesions in the subcortical white matter on cranial MR images in two Turkish brothers with cold-induced sweating syndrome caused by a novel missense mutation in the CRLF1 gene. *Brain Dev.* 2013;35(6):596-601.
116. Busch A, Zarkovic M, Lowe C, Jankofsky M, Ganschow R, Buers I, et al. Mutations in CRLF1 cause familial achalasia. *Clin Genet.* 2017;92(1):104-8.

117. Guruswamy Sangameswaran KD, Baradhi KM. Glomerulosclerosis, Focal Segmental. StatPearls. Treasure Island (FL)2018.
118. Konigshausen E, Sellin L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *Biomed Res Int.* 2016;2016:3765608.
119. Savin VJ, Sharma M, Zhou J, Gennochi D, Fields T, Sharma R, et al. Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family. *J Immunol Res.* 2015;2015:714964.
120. Sharma M, Zhou J, Gauchat JF, Sharma R, McCarthy ET, Srivastava T, et al. Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 inhibitors attenuate the effect of cardiotrophin-like cytokine factor 1 and human focal segmental glomerulosclerosis serum on glomerular filtration barrier. *Transl Res.* 2015;166(4):384-98.
121. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2003;53:139-58.
122. Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol.* 2001;29(8):927-36.
123. Cormier F, Dieterlen-Lievre F. The wall of the chick embryo aorta harbours M-CFC, G-CFC, GM-CFC and BFU-E. *Development.* 1988;102(2):279-85.
124. Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F, Marcos MA. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature.* 1993;364(6432):67-70.
125. Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller AM, Dzierzak EA. An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature.* 1993;364(6432):64-7.
126. Ikuta K, Kina T, MacNeil I, Uchida N, Peault B, Chien YH, et al. A developmental switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell.* 1990;62(5):863-74.
127. Baron MH, Vacaru A, Nieves J. Erythroid development in the mammalian embryo. *Blood Cells Mol Dis.* 2013;51(4):213-9.
128. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature.* 2015;518(7540):547-51.
129. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-95.
130. Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, et al. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol.* 2005;174(4):2336-42.
131. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38(4):792-804.
132. Zhang Y, Gao S, Xia J, Liu F. Hematopoietic Hierarchy - An Updated Roadmap. *Trends Cell Biol.* 2018;28(12):976-86.
133. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988;241(4861):58-62.
134. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1994;1(8):661-73.
135. Attar EC, Scadden DT. Regulation of hematopoietic stem cell growth. *Leukemia.* 2004;18(11):1760-8.

136. Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol.* 2014;42(2):74-82 e2.
137. Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, et al. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell.* 2010;6(1):48-58.
138. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):35-46.
139. Kumar R, Fossati V, Israel M, Snoeck HW. Lin-Sca1+kit- bone marrow cells contain early lymphoid-committed precursors that are distinct from common lymphoid progenitors. *J Immunol.* 2008;181(11):7507-13.
140. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-21.
141. Copley MR, Beer PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cell heterogeneity takes center stage. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):690-7.
142. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell.* 1997;91(5):661-72.
143. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature.* 2000;404(6774):193-7.
144. Radtke F, Wilson A, MacDonald HR. Notch signaling in T- and B-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(2):174-9.
145. Bakri Y, Sarrazin S, Mayer UP, Tillmanns S, Nerlov C, Boned A, et al. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood.* 2005;105(7):2707-16.
146. Lin H, Grosschedl R. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature.* 1995;376(6537):263-7.
147. Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R, et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell.* 2006;126(4):755-66.
148. Yeaman C, Wang D, Paz-Priel I, Torbett BE, Tenen DG, Friedman AD. C/EBPalpha binds and activates the PU.1 distal enhancer to induce monocyte lineage commitment. *Blood.* 2007;110(9):3136-42.
149. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989;74(1):1-10.
150. Schurch CM, Riether C, Ochsenbein AF. Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell.* 2014;14(4):460-72.
151. Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity.* 1994;1(9):725-31.
152. Knapp DJ, Hammond CA, Aghaeepour N, Miller PH, Pellacani D, Beer PA, et al. Distinct signaling programs control human hematopoietic stem cell survival and proliferation. *Blood.* 2017;129(3):307-18.
153. Zandstra PW, Conneally E, Petzer AL, Piret JM, Eaves CJ. Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(9):4698-703.

154. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, Gingras S, Ruel R, Mayotte N, et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science*. 2014;345(6203):1509-12.
155. Farese AM, Myers LA, MacVittie TJ. Therapeutic efficacy of recombinant human leukemia inhibitory factor in a primate model of radiation-induced marrow aplasia. *Blood*. 1994;84(11):3675-8.
156. Waring P, Wall D, Dauer R, Parkin D, Metcalf D. The effects of leukaemia inhibitory factor on platelet function. *Br J Haematol*. 1993;83(1):80-7.
157. Hyman DM, Brana I, Spreafico A, Schram AM, Pandya NB, Hoffman K, et al. A phase 1 study of MSC-1, a humanized anti-LIF monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. 2018;36(15\_suppl):TPS2602-TPS.
158. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1998;27(3):503-19.
159. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984;25(12):1277-94.
160. Havel RJ. The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J Lipid Res*. 1984;25(13):1570-6.
161. Tomkin GH, Owens D. Diabetes and dyslipidemia: characterizing lipoprotein metabolism. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2017;10:333-43.
162. Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2017;18(2):149-54.
163. Huynh TV, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid-beta and other amyloidogenic proteins. *J Lipid Res*. 2017;58(5):824-36.
164. Li K, Ching D, Luk FS, Raffai RL. Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor-kappaB-driven inflammation and atherosclerosis. *Circ Res*. 2015;117(1):e1-e11.
165. Burt TD, Agan BK, Marconi VC, He W, Kulkarni H, Mold JE, et al. Apolipoprotein (apo) E4 enhances HIV-1 cell entry in vitro, and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype accelerates HIV disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(25):8718-23.
166. Tudorache IF, Trusca VG, Gafencu AV. Apolipoprotein E - A Multifunctional Protein with Implications in Various Pathologies as a Result of Its Structural Features. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017;15:359-65.
167. Alaupovic P. Apolipoprotein composition as the basis for classifying plasma lipoproteins. Characterization of ApoA- and ApoB-containing lipoprotein families. *Prog Lipid Res*. 1991;30(2-3):105-38.
168. Eisenberg S. High density lipoprotein metabolism. *J Lipid Res*. 1984;25(10):1017-58.
169. Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46(4):1493-8.
170. Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res*. 2000;41(6):853-72.
171. Liu AC, Lawn RM, Verstuyft JG, Rubin EM. Human apolipoprotein A-I prevents atherosclerosis associated with apolipoprotein[a] in transgenic mice. *J Lipid Res*. 1994;35(12):2263-7.



172. Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, Martin-Campos JM, Julve J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res.* 2001;42(11):1727-39.
173. Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14788-94.
174. Green PH, Glickman RM, Riley JW, Quinet E. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. *J Clin Invest.* 1980;65(4):911-9.
175. Kohan AB, Wang F, Lo CM, Liu M, Tso P. ApoA-IV: current and emerging roles in intestinal lipid metabolism, glucose homeostasis, and satiety. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(6):G472-81.
176. Cladaras C, Hadzopoulou-Cladaras M, Nolte RT, Atkinson D, Zannis VI. The complete sequence and structural analysis of human apolipoprotein B-100: relationship between apoB-100 and apoB-48 forms. *EMBO J.* 1986;5(13):3495-507.
177. Marcel YL, Innerarity TL, Spilman C, Mahley RW, Protter AA, Milne RW. Mapping of human apolipoprotein B antigenic determinants. *Arteriosclerosis.* 1987;7(2):166-75.
178. Nakajima K, Nagamine T, Fujita MQ, Ai M, Tanaka A, Schaefer E. Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv Clin Chem.* 2014;64:117-77.
179. Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2001;12(3):297-304.
180. Poensgen J. Apolipoprotein C-1 inhibits the hydrolysis by phospholipase A2 of phospholipids in liposomes and cell membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1990;1042(2):188-92.
181. Wolska A, Dunbar RL, Freeman LA, Ueda M, Amar MJ, Sviridov DO, et al. Apolipoprotein C-II: New findings related to genetics, biochemistry, and role in triglyceride metabolism. *Atherosclerosis.* 2017;267:49-60.
182. Baggio G, Manzato E, Gabelli C, Fellin R, Martini S, Enzi GB, et al. Apolipoprotein C-II deficiency syndrome. Clinical features, lipoprotein characterization, lipase activity, and correction of hypertriglyceridemia after apolipoprotein C-II administration in two affected patients. *J Clin Invest.* 1986;77(2):520-7.
183. Luo M, Peng D. The emerging role of apolipoprotein C-III: beyond effects on triglyceride metabolism. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):184.
184. Rall SC, Jr., Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The complete amino acid sequence. *J Biol Chem.* 1982;257(8):4171-8.
185. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240(4852):622-30.
186. Hatters DM, Peters-Libeu CA, Weisgraber KH. Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(8):445-54.
187. Peters-Libeu CA, Newhouse Y, Hatters DM, Weisgraber KH. Model of biologically active apolipoprotein E bound to dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 2006;281(2):1073-9.
188. Hatters DM, Voss JC, Budamagunta MS, Newhouse YN, Weisgraber KH. Insight on the molecular envelope of lipid-bound apolipoprotein E from electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol.* 2009;386(1):261-71.

189. Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S178-82.
190. Chang S, Maeda N, Borensztajn J. The role of lipoprotein lipase and apoprotein E in the recognition of chylomicrons and chylomicron remnants by cultured isolated mouse hepatocytes. *Biochem J.* 1996;318 ( Pt 1):29-34.
191. Herz J, Chen Y, Masiulis I, Zhou L. Expanding functions of lipoprotein receptors. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S287-92.
192. Carlo AS. Sortilin, a novel APOE receptor implicated in Alzheimer disease. *Prion.* 2013;7(5):378-82.
193. Yajima R, Tokutake T, Koyama A, Kasuga K, Tezuka T, Nishizawa M, et al. ApoE-isoform-dependent cellular uptake of amyloid-beta is mediated by lipoprotein receptor LR11/SorLA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;456(1):482-8.
194. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Bba-Mol Cell Biol L.* 2010;1801(8):806-18.
195. Hauser PS, Narayanaswami V, Ryan RO. Apolipoprotein E: from lipid transport to neurobiology. *Prog Lipid Res.* 2011;50(1):62-74.
196. Vitek MP, Brown CM, Colton CA. APOE genotype-specific differences in the innate immune response. *Neurobiol Aging.* 2009;30(9):1350-60.
197. Wozniak MA, Riley EM, Itzhaki RF. Apolipoprotein E polymorphisms and risk of malaria. *J Med Genet.* 2004;41(3):145-6.
198. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, et al. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4138-49.
199. Braesch-Andersen S, Paulie S, Smedman C, Mia S, Kumagai-Braesch M. ApoE production in human monocytes and its regulation by inflammatory cytokines. *PLoS One.* 2013;8(11):e79908.
200. Baitsch D, Bock HH, Engel T, Telgmann R, Muller-Tidow C, Varga G, et al. Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(5):1160-8.
201. Stannard AK, Riddell DR, Sacre SM, Tagalakakis AD, Langer C, von Eckardstein A, et al. Cell-derived apolipoprotein E (ApoE) particles inhibit vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46011-6.
202. Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S183-8.
203. Eto M, Watanabe K, Ishii K. Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles (epsilon 2 and epsilon 4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clin Genet.* 1986;29(6):477-84.
204. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993;261(5123):921-3.
205. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008;118(12):4002-13.

206. Rohn TT. Proteolytic cleavage of apolipoprotein E4 as the keystone for the heightened risk associated with Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):14908-22.
207. Benjamin EJ, Virani SS, Callaway CW, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2018;137(12):e67-e492.
208. CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1958;57(143):1-20.
209. van Rooy MJ, Pretorius E. Obesity, hypertension and hypercholesterolemia as risk factors for atherosclerosis leading to ischemic events. *Curr Med Chem.* 2014;21(19):2121-9.
210. George SJ, Johnson J. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*; Wiley; 2010.
211. Luscher TF, Barton M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol.* 1997;20(11 Suppl 2):II-3-10.
212. Park KH, Park WJ. Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci.* 2015;30(9):1213-25.
213. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009;73(3):411-8.
214. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168-75.
215. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19.
216. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(12):3883-7.
217. Parthasarathy S, Steinbrecher UP, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Essential role of phospholipase A2 activity in endothelial cell-induced modification of low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(9):3000-4.
218. Fogelstrand P, Boren J. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2012;22(1):1-7.
219. Berliner JA, Gharavi NM. Endothelial cell regulation by phospholipid oxidation products. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(2):119-23.
220. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(5):842-51.
221. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest.* 2007;117(1):195-205.
222. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity.* 2017;47(4):621-34.
223. Choromanska B, Mysliwiec P, Choromanska K, Dadan J, Chabowski A. The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Adv Clin Exp Med.* 2017;26(4):717-22.
224. Febbraio M, Abumrad NA, Hajjar DP, Sharma K, Cheng W, Pearce SF, et al. A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* 1999;274(27):19055-62.

225. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(1):333-7.
226. Kelley JL, Ozment TR, Li C, Schweitzer JB, Williams DL. Scavenger receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(3):241-61.
227. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002;8(11):1235-42.
228. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407(6801):233-41.
229. Finn AV, Nakano M, Narula J, Kolodgie FD, Virmani R. Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(7):1282-92.
230. Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):692-702.
231. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
232. Vallejo-Vaz AJ, Robertson M, Catapano AL, Watts GF, Kastelein JJ, Packard CJ, et al. Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease Among Men With Primary Elevations of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels of 190 mg/dL or Above: Analyses From the WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study) 5-Year Randomized Trial and 20-Year Observational Follow-Up. *Circulation*. 2017;136(20):1878-91.
233. Furuya Y, Sekine Y, Kato H, Miyazawa Y, Koike H, Suzuki K. Low-density lipoprotein receptors play an important role in the inhibition of prostate cancer cell proliferation by statins. *Prostate Int*. 2016;4(2):56-60.
234. Emerging Risk Factors C, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009;302(18):1993-2000.
235. Birjmohun RS, Hutten BA, Kastelein JJ, Stroes ES. Increasing HDL cholesterol with extended-release nicotinic acid: from promise to practice. *Neth J Med*. 2004;62(7):229-34.
236. Sakai T, Kamanna VS, Kashyap ML. Niacin, but not gemfibrozil, selectively increases LP-AI, a cardioprotective subfraction of HDL, in patients with low HDL cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(11):1783-9.
237. Tall AR, Rader DJ. Trials and Tribulations of CETP Inhibitors. *Circ Res*. 2018;122(1):106-12.
238. Lin XL, Xiao LL, Tang ZH, Jiang ZS, Liu MH. Role of PCSK9 in lipid metabolism and atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:36-44.
239. Shapiro MD, Tavori H, Fazio S. PCSK9: From Basic Science Discoveries to Clinical Trials. *Circ Res*. 2018;122(10):1420-38.
240. Lepor NE, Kereiakes DJ. The PCSK9 Inhibitors: A Novel Therapeutic Target Enters Clinical Practice. *Am Health Drug Benefits*. 2015;8(9):483-9.
241. Gomes AL, Carvalho T, Serpa J, Torre C, Dias S. Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis. *Blood*. 2010;115(19):3886-94.
242. Chen HK, Liu Z, Meyer-Franke A, Brodbeck J, Miranda RD, McGuire JG, et al. Small molecule structure correctors abolish detrimental effects of apolipoprotein E4 in cultured neurons. *J Biol Chem*. 2012;287(8):5253-66.

243. Wang C, Najm R, Xu Q, Jeong DE, Walker D, Balestra ME, et al. Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat Med.* 2018;24(5):647-57.
244. Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases.* 2015;3(4):345-52.
245. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol.* 2000;67(5):699-704.
246. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1412-8.
247. Schlitt A, Heine GH, Blankenberg S, Espinola-Klein C, Dopheide JF, Bickel C, et al. CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels. *Thromb Haemost.* 2004;92(2):419-24.
248. Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1992;140(2):301-16.
249. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(18):8264-8.
250. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119-31.
251. Seneviratne AN, Sivagurunathan B, Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2012;413(1-2):3-14.
252. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(6):661-70.
253. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-81.
254. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest.* 1997;99(11):2752-61.
255. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. *Am J Pathol.* 2000;157(6):1819-24.
256. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol.* 2003;163(3):1117-25.
257. Cochain C, Zerneck A. Protective and pathogenic roles of CD8(+) T cells in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 2016;111(6):71.
258. Zhou J, Dimayuga PC, Zhao X, Yano J, Lio WM, Trinidad P, et al. CD8(+)CD25(+) T cells reduce atherosclerosis in apoE(-/-) mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(3):864-70.
259. Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest.* 2002;109(6):745-53.
260. Doran AC, Lipinski MJ, Oldham SN, Garney JC, Campbell KA, Skafien MD, et al. B-cell aortic homing and atheroprotection depend on Id3. *Circ Res.* 2012;110(1):e1-12.

261. Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz JD, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, et al. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *J Exp Med*. 2010;207(8):1579-87.
262. Kyaw T, Tay C, Hosseini H, Kanellakis P, Gadowski T, MacKay F, et al. Depletion of B2 but not B1a B cells in BAFF receptor-deficient ApoE mice attenuates atherosclerosis by potently ameliorating arterial inflammation. *PLoS One*. 2012;7(1):e29371.
263. Kyaw T, Tay C, Krishnamurthi S, Kanellakis P, Agrotis A, Tipping P, et al. B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ Res*. 2011;109(8):830-40.
264. Karvonen J, Paivansalo M, Kesaniemi YA, Horkko S. Immunoglobulin M type of autoantibodies to oxidized low-density lipoprotein has an inverse relation to carotid artery atherosclerosis. *Circulation*. 2003;108(17):2107-12.
265. Andican G, Seven A, Uncu M, Cantasdemir M, Numan F, Burcak G. Oxidized LDL and anti-oxLDL antibody levels in peripheral atherosclerotic disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(6):473-8.
266. Li H, Li DQ, Li XX, Wang LQ. The association between oxidized low-density lipoprotein antibodies and hematological diseases. *Lipids Health Dis*. 2016;15(1):190.
267. Wung BS, Hsu MC, Wu CC, Hsieh CW. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life Sci*. 2005;78(4):389-97.
268. Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol*. 2004;24(4):387-92.
269. Oleksowicz L, Mrowiec Z, Zuckerman D, Isaacs R, Dutcher J, Puszkun E. Platelet activation induced by interleukin-6: evidence for a mechanism involving arachidonic acid metabolism. *Thromb Haemost*. 1994;72(2):302-8.
270. Schuett H, Oestreich R, Waetzig GH, Annema W, Luchtefeld M, Hillmer A, et al. Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(2):281-90.
271. Moran CS, Campbell JH, Simmons DL, Campbell GR. Human leukemia inhibitory factor inhibits development of experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb*. 1994;14(8):1356-63.
272. Rolfe BE, Stamatou S, World CJ, Brown L, Thomas AC, Bingley JA, et al. Leukaemia inhibitory factor retards the progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2003;58(1):222-30.
273. Moran CS, Campbell JH, Campbell GR. Human leukemia inhibitory factor upregulates LDL receptors on liver cells and decreases serum cholesterol in the cholesterol-fed rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(7):1267-73.
274. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Leukemia inhibitory factor (LIF) inhibits angiogenesis in vitro. *J Cell Sci*. 1995;108 ( Pt 1):73-83.
275. Gillett NA, Lowe D, Lu L, Chan C, Ferrara N. Leukemia inhibitory factor expression in human carotid plaques: possible mechanism for inhibition of large vessel endothelial regrowth. *Growth Factors*. 1993;9(4):301-5.
276. Konii H, Sato K, Kikuchi S, Okiyama H, Watanabe R, Hasegawa A, et al. Stimulatory effects of cardiotrophin 1 on atherosclerosis. *Hypertension*. 2013;62(5):942-50.
277. Li X, Zhang X, Wei L, Xia Y, Guo X. Relationship between serum oncostatin M levels and degree of coronary stenosis in patients with coronary artery disease. *Clin Lab*. 2014;60(1):113-8.

278. Albasanz-Puig A, Murray J, Preusch M, Coan D, Namekata M, Patel Y, et al. Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):292-8.
279. Modur V, Feldhaus MJ, Weyrich AS, Jicha DL, Prescott SM, Zimmerman GA, et al. Oncostatin M is a proinflammatory mediator. In vivo effects correlate with endothelial cell expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules. *J Clin Invest*. 1997;100(1):158-68.
280. Bernard C, Merval R, Lebret M, Delerive P, Dusanter-Fourt I, Lehoux S, et al. Oncostatin M induces interleukin-6 and cyclooxygenase-2 expression in human vascular smooth muscle cells : synergy with interleukin-1beta. *Circ Res*. 1999;85(12):1124-31.
281. Saijonmaa O, Nyman T, Pacek P, Fyhrquist F. Oncostatin M regulates endothelin-1 production in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 1998;275(2 Pt 2):H662-7.
282. Watanabe T, Konii H, Sato K. Emerging Roles of Cardiotrophin-1 in the Pathogenesis and Biomarker of Atherosclerosis. 2018;1(1):10.
283. Monserrat L, Lopez B, Gonzalez A, Hermida M, Fernandez X, Ortiz M, et al. Cardiotrophin-1 plasma levels are associated with the severity of hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2011;32(2):177-83.
284. Saleh M, Shamsasanjan K, Movassaghpourakbari A, Akbarzadehlaleh P, Molaeipour Z. The Impact of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation of Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(3):299-304.
285. de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med*. 2012;367(24):2305-15.
286. Kim DH, Sohn SK, Won DI, Lee NY, Suh JS, Lee KB. Rapid helper T-cell recovery above  $200 \times 10^6/l$  at 3 months correlates to successful transplant outcomes after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(12):1119-28.
287. Penack O, Becker C, Buchheidt D, Christopeit M, Kiehl M, von Lilienfeld-Toal M, et al. Management of sepsis in neutropenic patients: 2014 updated guidelines from the Infectious Diseases Working Party of the German Society of Hematology and Medical Oncology (AGIHO). *Ann Hematol*. 2014;93(7):1083-95.
288. Pietras EM. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood*. 2017;130(15):1693-8.
289. Baldrige MT, King KY, Boles NC, Weksberg DC, Goodell MA. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature*. 2010;465(7299):793-7.
290. Boettcher S, Manz MG. Regulation of Inflammation- and Infection-Driven Hematopoiesis. *Trends Immunol*. 2017;38(5):345-57.
291. Chiba Y, Mizoguchi I, Hasegawa H, Ohashi M, Orii N, Nagai T, et al. Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(8):1363-76.
292. Matatall KA, Jeong M, Chen S, Sun D, Chen F, Mo Q, et al. Chronic Infection Depletes Hematopoietic Stem Cells through Stress-Induced Terminal Differentiation. *Cell Rep*. 2016;17(10):2584-95.
293. Papadaki HA, Gibson FM, Psyllaki M, Gordon-Smith EC, Marsh JC, Eliopoulos GD. Assessment of bone marrow stem cell reserve and function and stromal cell function in patients with severe congenital neutropenia. *Eur J Haematol*. 2001;67(4):245-51.

294. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5465-70.
295. Kovtonyuk LV, Fritsch K, Feng X, Manz MG, Takizawa H. Inflamm-Aging of Hematopoiesis, Hematopoietic Stem Cells, and the Bone Marrow Microenvironment. *Front Immunol*. 2016;7:502.
296. Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell*. 2004;3(4):161-7.
297. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99-118.
298. Beerman I, Bock C, Garrison BS, Smith ZD, Gu H, Meissner A, et al. Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):413-25.
299. Khurana S. The effects of proliferation and DNA damage on hematopoietic stem cell function determine aging. *Dev Dyn*. 2016;245(7):739-50.
300. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, et al. Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem*. 2003;278(10):7949-55.
301. Tormo AJ, Beaupre LA, Elson G, Crabe S, Gauchat JF. A polyglutamic acid motif confers IL-27 hydroxyapatite and bone-binding properties. *J Immunol*. 2013;190(6):2931-7.
302. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
303. Jackaman C, Yeoh TL, Acuil ML, Gardner JK, Nelson DJ. Murine mesothelioma induces locally-proliferating IL-10(+)TNF-alpha(+)CD206(-)CX3CR1(+) M3 macrophages that can be selectively depleted by chemotherapy or immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2016;5(6):e1173299.
304. Malyshev I, Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *Biomed Res Int*. 2015;2015:341308.
305. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10(2):417-26.
306. Lamkanfi M, Dixit VM. In Retrospect: The inflammasome turns 15. *Nature*. 2017;548(7669):534-5.
307. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, Russell D, Homer-Vanniasinkam S, Wheatcroft SB, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells*. 2015;4(2):178-201.
308. Prabhudas M, Bowdish D, Drickamer K, Febbraio M, Herz J, Kobzik L, et al. Standardizing scavenger receptor nomenclature. *J Immunol*. 2014;192(5):1997-2006.
309. Whelan FJ, Meehan CJ, Golding GB, McConkey BJ, Bowdish DM. The evolution of the class A scavenger receptors. *BMC Evol Biol*. 2012;12:227.
310. Han HJ, Tokino T, Nakamura Y. CSR, a scavenger receptor-like protein with a protective role against cellular damage caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum Mol Genet*. 1998;7(6):1039-46.
311. Jiang Y, Oliver P, Davies KE, Platt N. Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells. *J Biol Chem*. 2006;281(17):11834-45.



312. Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F, Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(4):1028-35.
313. Ohtani K, Suzuki Y, Eda S, Kawai T, Kase T, Keshi H, et al. The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276(47):44222-8.
314. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, et al. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci.* 2012;32(18):6391-410.
315. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science.* 2010;328(5986):1689-93.
316. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbato R, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2012;125(2):364-74.
317. Fisman EZ, Benderly M, Esper RJ, Behar S, Boyko V, Adler Y, et al. Interleukin-6 and the risk of future cardiovascular events in patients with angina pectoris and/or healed myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2006;98(1):14-8.
318. Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, et al. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *Isr Med Assoc J.* 2008;10(7):494-8.
319. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensor Actuat B-Chem.* 1999;54(1-2):3-15.
320. Cooper MA. Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(7):515-28.
321. Molino Y, David M, Varini K, Jabes F, Gaudin N, Fortoul A, et al. Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood-brain barrier. *FASEB J.* 2017;31(5):1807-27.
322. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 1997;138(4):877-89.
323. Castell JV, Geiger T, Gross V, Andus T, Walter E, Hirano T, et al. Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat. *Eur J Biochem.* 1988;177(2):357-61.
324. Hilton DJ, Nicola NA, Waring PM, Metcalf D. Clearance and fate of leukemia-inhibitory factor (LIF) after injection into mice. *J Cell Physiol.* 1991;148(3):430-9.
325. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 2011;13(4):423-33.
326. Dashti M, Kulik W, Hoek F, Veerman EC, Peppelenbosch MP, Rezaee F. A phospholipidomic analysis of all defined human plasma lipoproteins. *Sci Rep.* 2011;1:139.
327. Sparks RP, Jenkins JL, Miner GE, Wang Y, Guida WC, Sparks CE, et al. Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate binds to sortilin and competes with neurotensin: Implications for very low density lipoprotein binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;479(3):551-6.

328. Cizkova D, Le Marrec-Croq F, Franck J, Slovinska L, Grulova I, Devaux S, et al. Alterations of protein composition along the rostro-caudal axis after spinal cord injury: proteomic, in vitro and in vivo analyses. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:105.
329. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, et al. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord.* 2017;55(8):714-21.
330. Westergaard UB, Sorensen ES, Hermey G, Nielsen MS, Nykjaer A, Kirkegaard K, et al. Functional organization of the sortilin Vps10p domain. *J Biol Chem.* 2004;279(48):50221-9.
331. Campbell C, Beug S, Nickerson PE, Peng J, Mazerolle C, Bassett EA, et al. Sortilin regulates sorting and secretion of Sonic hedgehog. *J Cell Sci.* 2016;129(20):3832-44.
332. Roux KJ, Kim DI, Raida M, Burke B. A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 2012;196(6):801-10.
333. Frei AP, Jeon OY, Kilcher S, Moest H, Henning LM, Jost C, et al. Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nat Biotechnol.* 2012;30(10):997-1001.
334. Frei AP, Moest H, Novy K, Wollscheid B. Ligand-based receptor identification on living cells and tissues using TRICEPS. *Nat Protoc.* 2013;8(7):1321-36.
335. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4<sup>+</sup> T cells. *Science.* 2010;327(5969):1098-102.
336. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1341-6.
337. Gessner A, Blum H, Rollinghoff M. Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology.* 1993;189(5):419-35.
338. Yang YC, Ricciardi S, Ciarletta A, Calvetti J, Kelleher K, Clark SC. Expression cloning of cDNA encoding a novel human hematopoietic growth factor: human homologue of murine T-cell growth factor P40. *Blood.* 1989;74(6):1880-4.
339. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol.* 2012;13(10):981-90.
340. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, Dardalhon V, Awasthi A, Imitola J, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3<sup>+</sup> natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(31):12885-90.
341. Li J, Chen S, Xiao X, Zhao Y, Ding W, Li XC. IL-9 and Th9 cells in health and diseases-From tolerance to immunopathology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017;37:47-55.
342. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3<sup>+</sup> T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347-55.
343. Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4<sup>+</sup> T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol.* 1994;153(9):3989-96.
344. Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev.* 2013;252(1):104-15.



# **Annexe I.**

## **Revue de littérature**

Pasquin, S. Sharma, M. Gauchat, J. F. (2016). Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism. *Cytokine*. 82: 122-124.

Article publié dans *Cytokine*

## Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism

Sarah Pasquin <sup>a</sup>, Mukut Sharma <sup>b</sup>, Jean-François Gauchat <sup>a,†</sup>

<sup>a</sup> Département de Pharmacologie, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

<sup>b</sup> Renal Division, KCVA Medical Center, 4801 Linwood Blvd, Kansas City, MO 64128, USA

† Corresponding author.

E-mail address: [jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca) (J.-F. Gauchat).

**Keywords:** gp130, Leukemia inhibitory factor Cytokines, Metabolism Obesity

S. Pasquin et al. / Cytokine 82 (2016) 122–124

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.12.019> 1043-4666/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## **Abstract**

The incidence of obesity is increasing worldwide. Obesity is accompanied by a chronic inflammatory state that increases the risk of metabolic diseases such as insulin-resistance and type 2 diabetes. Over the past two decades, interest in immunomodulatory cytokines as potential mediators and/or targets for treatment or prevention of obesity and metabolic syndrome has increased. In this review, we summarize studies that revealed the effects of LIF family cytokines on adipose tissue, energy expenditure and food intake, highlighting the importance of gp130/LIFR $\beta$  signaling in obesity and obesity-related metabolic diseases.

## 1. Introduction

The IL-6 superfamily of inflammatory cytokines regroups functionally related cytokines acting through a receptor complex comprising gp130 and partner molecule(s). Among them, leukemia inhibitory factor (LIF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1) and cardiotrophin-like cytokine factor (CLCF1) share gp130/LIFR $\beta$  as a receptor chain signaling unit [1–3]. Activation of these two signaling chains regulates complex cellular processes such as hematopoiesis, neuronal differentiation, bone remodeling and inflammation through the activation of Janus kinases (JAK), signal transducers and activators of transcription (STATs), MAP-Kinase and PI(3)-Kinase signaling pathways. Mutations inactivating LIFR $\beta$  subunit lead to severe phenotype in patients (Stüve-Wiedemann syndrome) suggesting important non-redundant roles for these five cytokines [4]. Past research on CNTF and LIF combined with recent studies on CT-1 and OSM have pointed out important roles for gp130/LIFR $\beta$  signaling in metabolism and lipid homeostasis, likely to be non-redundant with the evolutionarily related (orthologous) cytokine leptin [3].

## 2. The gp130/LIFR $\beta$ complex

gp130 and LIFR $\beta$  are two structurally related single pass transmembrane receptor chains each containing JAK binding sites in its intracellular domain [3,5,6]. LIFR $\beta$  contains two cytokine binding domains, an immunoglobulin-like domain and three fibronectin type III segments in its extracellular region whereas gp130 extracellular segment is composed of one cytokine binding domain, one immunoglobulin-like domain and three fibronectin type III segment [1,3,7]. LIF can activate the gp130/LIFR $\beta$  complex in a 1:1:1 stoichiometry that enables binding between the cytokine binding domain of gp130 and the immunoglobulin-like domain of LIFR $\beta$ . Whereas LIF and hOSM can directly trigger the dimerization of gp130/LIFR $\beta$  complex [8], CNTF, CLCF1 and likely CT-1 require the implication of a non-signaling alpha chain. CNTF and CLCF1 bind to their receptor complex by sequentially recruiting a glycosyl phosphatidylinositol-anchored CNTFR $\alpha$  chain, gp130 and LIFR $\beta$  [9–12]. Although CT-1 has been shown to directly activate gp130/LIFR $\beta$  complex the existence of a yet to be identified CT-1R $\alpha$  was postulated to explain specific high potency of this cytokine [13].

Cytokine-receptor binding leads to the activation of Janus kinases JAK1, JAK2 and TYK2 by transphosphorylation followed by tyrosine phosphorylation of the intracellular gp130/LIFR $\beta$  receptor signaling chain regions [14]. This initiates activation of the JAK/STAT (1, 3, 5) [6], MAP-Kinase, and PI(3)-Kinases signaling pathways responsible for gene regulation [15–19].

### **3. CNTF, CT-1, OSM and LIF regulate body weight and energy expenditure**

Intraperitoneal injections of CNTF in leptin deficient ob/ob mice that are markedly hyperphagic and diet-induced obese mice led to a dose-dependent decrease in food intake and weight loss. CNTF also corrected hyperglycemia and hyperinsulinemia in ob/ob mice [20]. These results suggest that CNTF can overcome leptin resistance [20,21]. The anorectic effect of CNTF was suggested to be due to a hypothalamic inhibition of the orexigenic signal mediated by neuropeptide Y (NPY). CNTF-induced activation of central STAT3 is believed to reduce the supply of NPY and suppress its action on target hypothalamic sites [22]. CNTF anorectic effect was also observed in patients receiving prolonged administration of the cytokine, triggering the interest of the potential of the cytokine in treatment of obesity [23]. A recombinant (r) human CNTF derivative (Axokine) was tested in a phase II clinical study resulting in significant weight loss in obese patients [24,25]. Peripheral side effects and the development of neutralizing antibodies during the phase III trial halted the development of this molecule [25]. Chronic injection of rCLCF1 at high dose was also shown to induce body weight loss in mice [26]. Since both cytokines act through the same receptor complex, CLCF1 likely shares the mechanistic pathway with CNTF for regulating body weight.

Like CNTF, CT-1 was recently shown to have an important effect on body weight. In a study published in 2011, Moreno-Aliaga et al. demonstrated that the lack of CT-1 in mice leads to adult onset obesity [27]. Moreover, chronic rCT-1 administration reduces body weight and fat accumulation in diet-induced or genetically obese rodents [28]. These observations can be explained by the potential activation of the hypothalamic anorexigenic pathway by CT-1, as previously observed with CNTF. Similarly, daily intraperitoneal injections of OSM in diet-



induced and ob/ob obese mice induced beneficial effects in these models of obesity and metabolic syndrome [29].

Similarly, LIF administration through intracerebroventricular injection of a recombinant adeno-associated viral vector encoding LIF (rAAV-LIF) in rats led to a significant reduction of food intake and body weight gain [30]. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that LIF can significantly modulate the release of the orexigenic neuropeptide NPY [31].

#### **4. LIF, CNTF, CT-1 and OSM effect on adipogenesis**

Numerous studies indicate that cytokines of the LIF family act directly in periphery to modulate adipogenesis. For example, CT-1 can regulate lipolysis in murine adipocyte cell lines and in the mouse white adipose tissue (WAT). Gene silencing studies using siRNA in 3T3-L1 adipocytes led to highlight the importance of PKA-mediated phosphorylation in the lipolytic effect of CT-1 [32,33]. Enhanced PKA-phosphorylation was also observed in WAT of ob/ob mice after CT-1 injection leading to upregulation of hormone sensitive lipase expression and increased adipose triglyceride lipase activity [33]. CT-1 can also induce the browning of adipocytes *in vitro*. Altogether, these data are suggesting important peripheral roles of CT-1 in the anti-obesity action of the cytokine.

OSM is also a potent inhibitor of adipogenesis in the 3T3-L1 cell line model. OSM was shown to upregulate STAT5 phosphorylation and ERK signaling pathway in murine preadipocytes attenuating C/EBP $\beta$ -induced adipogenesis [34]. Whereas LIF is not a strong inducer of ERK signaling pathway, LIF treatment on preadipocytes leads to STAT3 and STAT5 phosphorylation resulting in adipogenesis inhibition [34,35].

CNTF, like other cytokines of the LIF family, can directly regulate adipocyte metabolism. CNTF induces STAT3 phosphorylation in cultured 3T3-L1 adipocytes and rodent primary adipocytes [36]. CNTF was shown to trigger the AKT pathway in preadipocytes, while activation of MAPK-Erk1/2 was observed in mature adipocytes. *In vitro*, CNTF treatment does not upregulate the levels of adipocyte transcription factors PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  but increases

insulin sensitivity by upregulating the expression of glucose transporter 4 (GLUT4) and insulin receptor subunit-1 (IRS-1). Interestingly, levels of mRNA for CNTFR $\alpha$  are upregulated in ob/ob mice [36]. In brown adipocytes, functional studies indicate that CNTF modulates energy homeostasis by enhancing  $\beta$ 3-adrenergic stimulation of uncoupling protein-1 (UCP1), the protein responsible for producing heat instead of ATP [37].

## **5. Glucose uptake and insulin signaling**

In obesity and obesity-mediated metabolic diseases, impaired insulin signaling and skeletal muscle glucose uptake is observed as well as lipid accumulation. Signaling through gp130/LIFR $\beta$  complexes seems to have a great importance in the regulation of glucose uptake, insulin sensibility, fatty acid oxidation and lipogenesis.

CNTF has long been known as a regulator of energy homeostasis. Skeletal muscles express the heterotrimeric CNTF receptor and CNTF activates AMPK and PI3/AKT in muscles, therefore increasing lipid oxidation and GLUT4 expression [38]. CNTF treatment in mice reduced blood glucose concentration and increased glucose uptake in lean mouse skeletal muscles via the activation of PI3K/AKT. The anorectic effects of CNTF were diminished by 50% in insulin-resistant rodent models, a decrease that might be explained by the suppression of CNTF-induced AKT phosphorylation [38]. Interestingly, CNTF maintains lipid oxidation as well as STAT3 and AMPK activation in skeletal muscle of obese mice [39]. Considering its role in the regulation of glucose uptake and insulin sensibility, CNTF is a promising cytokine for the treatment of obesity-related metabolic diseases such as diabetes. Of note, CNTF was recently shown to induce reprogramming of acinar cell and regeneration of functional beta cell mass in diabetic mice, a property that could contribute to its therapeutic potential in metabolic diseases [40].

LIF was shown to play an important role in the control of glucose uptake in highly oxidative and glycolytic muscles. Mediating its effect by a mechanism different than that of CNTF, LIF-induced glucose uptake depends on the PI3-kinase pathway and mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2), but not STAT3 or AMPK [41].

Along similar lines, chronic administration of CT-1 in obese mice reduces hyperinsulinemia and hyperglycemia, suggesting a role for this cytokine in the regulation of glucose uptake [27]. In the liver, CT-1 increases AMPK activation resulting in hepatic fatty acid oxidation, suppression of lipogenesis and promotion of lipophagy [42].

The effect of chronic administration of OSM in diet-induced obese mouse models was also recently investigated. These studies led to the conclusion that OSM, like CT-1, can reduce hepatic steatosis. OSM was shown to regulate the expression of genes related to fatty acid synthesis such as fatty acid synthase and stearoyl CoA desaturase-1 [29,43]. Moreover, OSM treated mice showed lower serum levels of cholesterol and triglycerides. OSM treatment in mice with diet-induced obesity and genetically obese mice was beneficial with regard to insulin resistance. These findings have positioned OSM as a promising cytokine for the treatment of obesity-related metabolic diseases.

## **6. Conclusion**

Altogether several lines of investigation suggest potent non-redundant roles for the cytokines of the LIF family in adipogenesis-regulation, insulin-signaling and metabolism. Whereas LIF and OSM exert broad pleiotropic actions, CNTF, CLCF1 and CT-1 act in a more specific manner due to the limited expression of their respective  $\alpha$ -chains. All five cytokines exert significant yet diverse effects on lipogenesis in adipocytes and hepatic cells. Furthermore, through its central and peripheral action LIFR $\beta$ /gp130 signaling induces anorectic effect and body weight regulation. Observations from studies using genetically obese mice indicate that LIF family cytokines mediate their effects through leptin independent-pathways, suggesting that these cytokines could overcome leptin resistance in obese patients. Novel results on the ability of CNTF to induce acinar cell reprogramming in diabetic mice may further elicit interest in this family of cytokine as candidates for the treatment of obesity and obesity-related metabolic diseases.

## **Acknowledgments**

This work was supported by a Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; J-FG; MOP-57832). SP was supported by a fellowship from the Fonds de Recherche du Québec–Santé. MS received support in part from the Department of Veterans Affairs, Veterans Health Administration, Office of Research and Development (VABX001037) and MBRF, KCVA Medical Center, Kansas City, MO, USA.

We apologize to all investigators whose work could not be cited due to the scope of the subject and space limitations.

## References

- [1] J. Bravo, J.K. Heath, Receptor recognition by gp130 cytokines, *EMBO J.* 19 (2000) 2399–2411.
- [2] P.C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Muller-Newen, F. Schaper, Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem. J.* 374 (2003) 1–20.
- [3] M.O. Huising, C.P. Kruiswijk, G. Flik, Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines, *J. Endocrinol.* 189 (2006) 1–25.
- [4] N. Dagoneau, D. Scheffer, C. Huber, L.I. Al-Gazali, M. Di Rocco, A. Godard, et al., Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve- Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 298–305.
- [5] D.P. Gearing, C.J. Thut, T. VandeBos, S.D. Gimpel, P.B. Delaney, J. King, et al., Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130, *EMBO J.* 10 (1991) 2839–2848.
- [6] P.C. Heinrich, I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, L. Graeve, Interleukin- 6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem. J.* 334 (Pt 2) (1998) 297–314.
- [7] M.G. Hinds, T. Maurer, J.G. Zhang, N.A. Nicola, R.S. Norton, Solution structure of leukemia inhibitory factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13738–13745.
- [8] D.P. Gearing, M.R. Comeau, D.J. Friend, S.D. Gimpel, C.J. Thut, J. McGourty, et al., The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor, *Science (New York, NY)* 255 (1992) 1434–1437.
- [9] N. Panayotatos, E. Radziejewska, A. Acheson, R. Somogyi, A. Thadani, W.A. Hendrickson, et al., Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function- related epitope topography among helical cytokines, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14007–14014.

- [10] S. Davis, T.H. Aldrich, N. Stahl, L. Pan, T. Taga, T. Kishimoto, et al., LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor, *Science (New York, NY)* 260 (1993) 1805–1808.
- [11] G.C. Elson, E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, et al., CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 867–872.
- [12] S. Davis, T.H. Aldrich, D.M. Valenzuela, V.V. Wong, M.E. Furth, S.P. Squinto, et al., The receptor for ciliary neurotrophic factor, *Science (New York, NY)* 253 (1991) 59–63.
- [13] O. Robledo, M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard- Barthelaix, et al., Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 4855–4863.
- [14] M.J. Boulanger, A.J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker, K.C. Garcia, Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130, *Mol. Cell* 12 (2003) 577–589.
- [15] D. Guschin, N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, et al., A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *EMBO J.* 14 (1995) 1421–1429.
- [16] M. Narazaki, B.A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J.N. Ihle, et al., Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 2285–2289.
- [17] N. Stahl, T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, et al., Association and activation of Jak–Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science (New York, NY)* 263 (1994) 92–95.
- [18] C. Luttkien, U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, et al., Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science (New York, NY)* 263 (1994) 89–92.
- [19] N. Stahl, T.J. Farruggella, T.G. Boulton, Z. Zhong, J.E. Darnell Jr., G.D. Yancopoulos, Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors, *Science (New York, NY)* 267 (1995) 1349–1353.

- [20] I. Gloaguen, P. Costa, A. Demartis, D. Lazzaro, A. Di Marco, R. Graziani, et al., Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 6456–6461.
- [21] P.D. Lambert, K.D. Anderson, M.W. Sleeman, V. Wong, J. Tan, A. Hjarunguru, et al., Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 4652–4657.
- [22] S. Pu, H. Dhillon, L.L. Moldawer, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Neuropeptide Y counteracts the anorectic and weight reducing effects of ciliary neurotrophic factor, *J. Neuroendocrinol.* 12 (2000) 827–832.
- [23] R.G. Miller, W.W. Bryan, M.A. Dietz, T.L. Munsat, J.H. Petajan, S.A. Smith, et al., Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology* 47 (1996) 1329–1331.
- [24] A. Preti, Axokine (Regeneron), *IDrugs: Investig. Drugs J.* 6 (2003) 696–701.
- [25] M.P. Ettinger, T.W. Littlejohn, S.L. Schwartz, S.R. Weiss, H.H. McIlwain, S.B. Heymsfield, et al., Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study, *JAMA* 289 (2003) 1826–1832.
- [26] G. Senaldi, B.C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, et al., Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11458–11463.
- [27] M.J. Moreno-Aliaga, N. Perez-Echarri, B. Marcos-Gomez, E. Larequi, F.J. Gil-Bea, B. Viollet, et al., Cardiostrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism, *Cell Metab.* 14 (2011) 242–253.
- [28] M.J. Moreno-Aliaga, M.A. Romero-Lozano, D. Castano, J. Prieto, M. Bustos, Role of cardiostrophin-1 in obesity and insulin resistance, *Adipocyte* 1 (2012) 112–115.
- [29] T. Komori, M. Tanaka, H. Furuta, T. Akamizu, A. Miyajima, Y. Morikawa, Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice, *Diabetologia* 58 (2015) 1868–1876.
- [30] E. Beretta, H. Dhillon, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Central LIF gene therapy suppresses food intake, body weight, serum leptin and insulin for extended periods, *Peptides* 23 (2002) 975–984.

- [31] H. Nawa, S. Nakanishi, P.H. Patterson, Recombinant cholinergic differentiation factor (leukemia inhibitory factor) regulates sympathetic neuron phenotype by alterations in the size and amounts of neuropeptide mRNAs, *J. Neurochem.* 56 (1991) 2147–2150.
- [32] S. Zvonic, J.C. Hogan, P. Arbour-Reily, R.L. Mynatt, J.M. Stephens, Effects of cardiotrophin on adipocytes, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47572–47579.
- [33] M. Lopez-Yoldi, M. Fernandez-Galilea, L.M. Laiglesia, E. Larequi, J. Prieto, J.A. Martinez, et al., Cardiotrophin-1 stimulates lipolysis through the regulation of main adipose tissue lipases, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2634–2643.
- [34] Y. Miyaoka, M. Tanaka, T. Naiki, A. Miyajima, Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37913–37920.
- [35] J.C. Hogan, J.M. Stephens, Effects of leukemia inhibitory factor on 3T3-L1 adipocytes, *J. Endocrinol.* 185 (2005) 485–496.
- [36] S. Zvonic, P. Cornelius, W.C. Stewart, R.L. Mynatt, J.M. Stephens, The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2228–2235.
- [37] V. Ott, M. Fasshauer, A. Dalski, H.H. Klein, J. Klein, Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis, *J. Endocrinol.* 173 (2002) R1–R8.
- [38] G.R. Steinberg, M.J. Watt, M. Ernst, M.J. Birnbaum, B.E. Kemp, S.B. Jorgensen, Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase- dependent pathway that is impaired with obesity, *Diabetes* 58 (2009) 829– 839.
- [39] M.J. Watt, N. Dzamko, W.G. Thomas, S. Rose-John, M. Ernst, D. Carling, et al., CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK, *Nat. Med.* 12 (2006) 541–548.
- [40] L. Baeyens, M. Lemper, G. Leuckx, S. De Groef, P. Bonfanti, G. Stange, et al., Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 76–83.
- [41] N. Brandt, H.M. O’Neill, M. Kleinert, P. Schjerling, E. Vernet, G.R. Steinberg, et al., Leukemia inhibitory factor increases glucose uptake in mouse skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 309 (2015) E142–E153.



- [42] D. Castano, E. Larequi, I. Belza, A.M. Astudillo, E. Martinez-Anso, J. Balsinde, et al., Cardiostrophin-1 eliminates hepatic steatosis in obese mice by mechanisms involving AMPK activation, *J. Hepatol.* 60 (2014) 1017–1025.
- [43] T. Komori, M. Tanaka, E. Senba, A. Miyajima, Y. Morikawa, Deficiency of oncostatin M receptor beta (OSMRbeta) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 13821–13837.

## **Annexe II.**

### **Revue de littérature**

Pasquin, S\*, Sharma, M, Gauchat, J-F. (2015). Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies. *Cytokine and Growth Factor Reviews.*: 1-9.

Article publié dans *Cytokine and Growth Factor Reviews*

# **Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies**

Sarah Pasquin <sup>a</sup>, Mukut Sharma <sup>b</sup>, Jean-François Gauchat <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Département de Pharmacologie, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

<sup>b</sup> Renal Division, KCVA Medical Center, 4801 Linwood Blvd, Kansas City, MO 64128, USA

\* Corresponding author.

E-mail address: [jf.gauchat@umontreal.ca](mailto:jf.gauchat@umontreal.ca) (J.-F. Gauchat).

**Keywords:** Ciliary neurotrophic factor Neurogenesis, Huntington's disease, Amyotrophic lateral sclerosis, Age-related macular degeneration Obesity

**Abbreviations:** CNTF, ciliary neurotrophic factor; CNTFR, ciliary neurotrophic factor receptor; LIFR, leukemia inhibitor factor receptor; gp130, glycoprotein-130; IL6, Interleukin-6; IFN $\gamma$ , interferon gamma; JAK, Janus kinases; STAT, signal transducers and activators of transcription; MAPK, mitogen-activated protein kinases; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; AMPK, AMP-activated protein kinase; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; LDL, low-density lipoprotein; BHK, baby hamster kidney fibroblasts; RPE, retinal pigment epithelial; SHP2, Src-homology 2 domain-containing phosphatase 2; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; AMD, age-related macular degeneration; AD, Alzheimer's disease; MS, multiple sclerosis; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein.

Cytokine & Growth Factor Reviews 26 (2015) 507–515

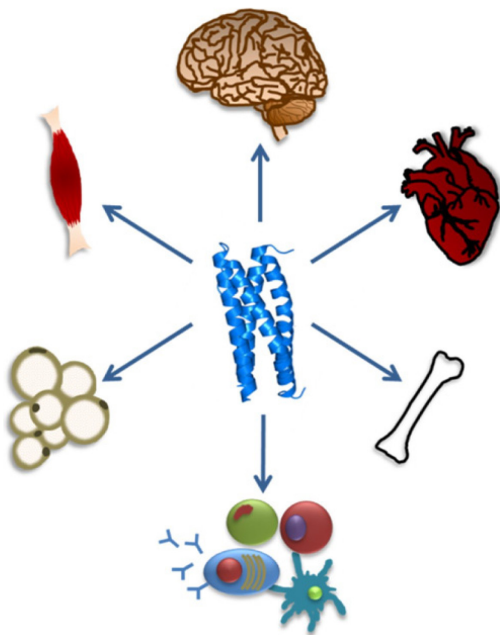
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.007> 1359-6101/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved

## **Abstract**

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is the most extensively studied member of the cytokine family that signal through intracellular chains of the gp130/LIFR $\beta$  receptor. The severe phenotype in patients suffering from mutations inactivating LIFR $\beta$  indicates that members of this cytokine family play key, non-redundant roles during development. Accordingly, three decades of research has revealed potent and promising trophic and regulatory activities of CNTF in neurons, oligodendrocytes, muscle cells, bone cells, adipocytes and retinal cells. These findings led to clinical trials to test the therapeutic potential of CNTF and CNTF derivatives for treating neurodegenerative and metabolic diseases. Promising results have encouraged continuation of studies for treating retinal degenerative diseases. Results of some clinical trials showed that side-effects may limit the systemically administered doses of CNTF. Therefore, therapies being currently tested rely on local delivery of CNTF using encapsulated cytokine-secreting implants. Since the side effects of CNTF might be linked to its ability to activate the alternative IL6R $\alpha$ -LIFR $\beta$ -gp130 receptor, CNTFR-specific mutants of CNTF have been developed that bind to the CNTFR $\alpha$ -LIFR $\beta$ -gp130 receptor. These developments may prove to be a breakthrough for therapeutic applications of systemically administered CNTF in pathologies such as multiple sclerosis or Alzheimer's disease. The "designer cytokine approach" offers future opportunities to further enhance specificity by conjugating mutant CNTF with modified soluble CNTFR $\alpha$  to target therapeutically relevant cells that express gp130-LIFR $\beta$  and a specific cell surface marker.

## 1. Introduction

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a pluripotent neurotrophic factor originally isolated from chick embryo ciliary neurons [1]. CNTF has potent effects on the development and maintenance of the nervous system, inducing neuronal survival and differentiation by stimulating gene expression of sensory, sympathetic and motor neurons. Its effect on motor neurons led to preclinical and clinical studies in neurodegenerative diseases such as Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and, to promising clinical trial results in the prevention of age-related macular degeneration. Substantial weight loss following CNTF systemic administration suggested roles for this trophic factor in metabolism and energy balance. Furthermore CNTF exerts myotrophic activities and is also considered as a myokine capable of modulating osteoblast function [2] (Fig. 1). Along with other members of the IL6 family, CNTF exerts pleiotropic activities through multiple signaling pathways including Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STATs), leading to diverse gene transcription regulation.



**Fig. 1. CNTF's pleiotropic activities.** Through the activation of its main or secondary receptors, CNTF can trigger the activation of numerous cell types. First considered as a neurotrophic factor, CNTF was extensively studied for its activity on the central and peripheral nervous system. Although, CNTF was further shown to play roles on cardiomyocytes, osteoblasts, immune cells, adipocytes as well as skeletal muscle cells (CNTF 3D structure is freely available at <http://www.ebi.ac.uk/>).

## 2. The protein

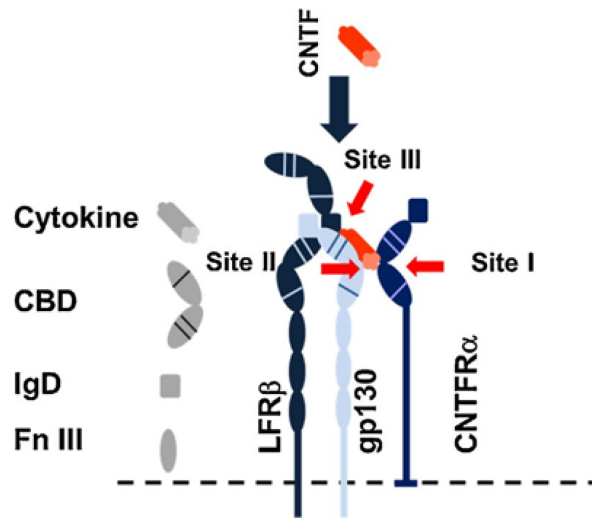
CNTF is a 22.7 kDa polypeptide chain encoded by a gene located on human chromosome 11 [3]. It was initially isolated in late 1980, from chick embryo ciliary ganglion neurons and later on cloned from rat and rabbit sciatic nerves [4,5]. Similarly, to other class-I helical cytokine, CNTF is folded in a four anti-parallel alpha-helices bundle [6]. Like IL6, CNTF belong to the long chain group, with ~25 amino acids alpha chains. The tertiary structure of the cytokine (Fig. 1) allows three binding sites for its interaction with a heterotrimeric receptor composed of the ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFR $\alpha$ ), glycoprotein-130 (gp130) and the leukemia inhibitor factor receptor (LIFR $\beta$ ; Fig. 2) [7]. CNTF is therefore considered as a member of the cytokine family signaling through LIFR $\beta$  and gp130; sharing redundant activities with LIF, cardiotrophin-1, cardiotrophin-like cytokine. Each member of the family has important specific roles as indicated by the severe phenotype of the Stüve–Wiedemann syndrome caused by null mutations in LIFR $\beta$  [8].

CNTF is expressed by glial cells of the spinal cord, astrocytes, Schwann cells and skeletal muscles [9–12]. It is found in large amount in the brain, the eye, the bone and the liver. Intriguingly, CNTF lacks a peptide signal. It is therefore not secreted by the classical endocytoplasmic reticulum-Golgi secretory pathway but is believed to be a trauma factor released following glial cell rupture in response to injury [11].

CNTF pharmacokinetics properties were investigated by intravenous injections of a radioiodinated form of the cytokine in rats. CNTF has a short half-life (2.9 min), where 75% of the cytokine is uptaken by the liver within the first 10 min [13]. Subcutaneous injections in patients resulted in peak plasma concentrations within 3-4 h [14]. Half-life varied between 120 and 400 min and elimination followed first order processes. In both rat and patient CNTF injection led to acute phase response [13,14].

### 3. CNTF receptors and signaling pathways

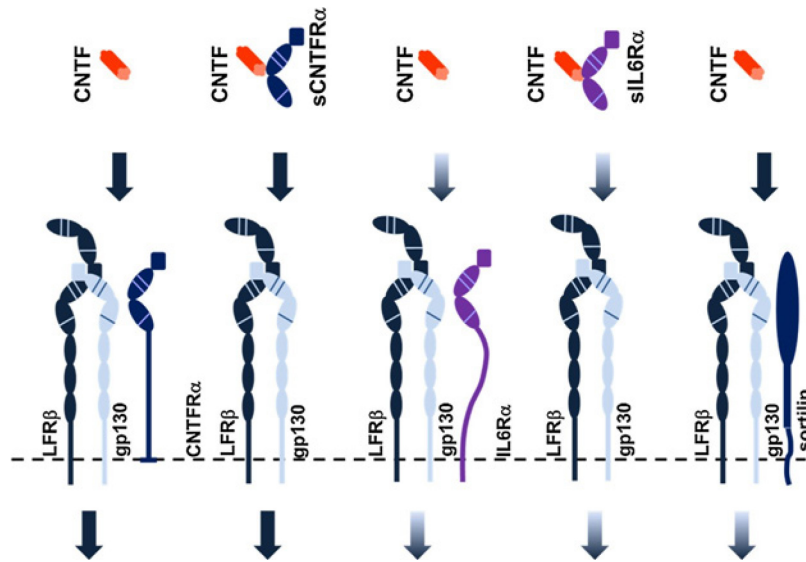
The CNTF receptor is composed of three components: a glycosylphosphatidylinositol-anchored non-signaling subunit CNTFR $\alpha$ , and two signaling chains gp130 and LIFR $\beta$  [15–17]. CNTF binds to its receptor in a stepwise fashion by first recruiting the GPI-anchored CNTFR $\alpha$  chain in a 1:1 stoichiometry. The CNTF/CNTFR $\alpha$  complex subsequently binds to gp130 and finally recruits the LIFR $\beta$  chain (Fig. 2) [15,16,18]. The heterodimerisation of signal-transducing chains gp130 and LIFR $\beta$  induce the activation of numerous signaling pathways leading to the activation of gene transcription (Fig. 4). While gp130 and LIFR $\beta$  are broadly distributed, CNTFR $\alpha$  is mainly expressed in the brain, the retina and the skeletal muscles [19–21]. Recent proteomics analysis further demonstrated a substantial expression of CNTFR $\alpha$  in the bone, the gut, the kidney and the adipocytes (freely available at <https://www.proteomicsdb.org/>). Alternatively, CNTF can exhibit broader effects by activating LIFR expressing cells through the formation of a complex with soluble forms of CNTFR $\alpha$  (“trans-signaling”) (Fig. 3) [22,23]. Such soluble CNTFR $\alpha$  forms have been detected in serum and cerebrospinal fluid [23]. Recombinant rat CNTF at high concentrations, unlike its human homologue, has been shown to trigger a response in cells expressing LIFR $\beta$  and gp130 in the absence of CNTFR $\alpha$  [24,25]. Human CNTF however does not have the capacity to induce the heterodimerisation of gp130 and LIFR $\beta$ , although IL6 receptor alpha chain (IL6R $\alpha$ ; soluble or membrane-bound) can act as a substitute a chain when CNTF is present in high concentration (Fig. 3) [26]. This capacity to signal through an IL6R $\alpha$ , gp130 and LIFR $\beta$  tripartite receptor might contribute to the side effects observed in patients upon systemic administration of CNTF [26].



**Fig. 2. CNTF activates the tripartite CNTFR in a stepwise fashion.** CNTF's binding site I is recruited by the cytokine binding domain (CBD) of CNTFR $\alpha$ . The CNTFR $\alpha$ -CNTF complex then recruits gp130 and LIFR $\beta$  through interactions involving CNTF site II-gp130 CBD and CNTF site III-LIFR $\beta$  immunoglobulin domain (IgD) triggering the heterodimerisation and activation of the receptor signaling chains, LIFR $\beta$  and gp130. Fn III, fibronectin type III domain

More recently, CNTF has been shown to bind sortilin with an affinity higher than CNTFR $\alpha$  (Fig. 3) [27]. *In vitro* studies demonstrated that sortilin could substitute for CNTFR $\alpha$  to facilitate the recruitment and activation of the signaling chains gp130 and LIFR $\beta$  [27]. Sortilin is a protein of the vacuolar protein-sorting 10 protein (VPS10P) domain receptor family containing a 700 amino acid extracellular domain forming a 10-bladed  $\beta$  propeller [28,29]. Sortilin has with multiple functions. Notably, in genome-wide association studies, the sortilin locus Sort-1 was associated with elevated LDL levels and elevated risks of myocardial infarction [30]. Sortilin forms with p75<sup>NTR</sup> a pro-neurotrophin receptor mediating pro-neurotrophin-induced neuronal apoptosis during development [31–33]. Sortilin also modulates the immune response, participating in B cell survival regulation, pro-nerve growth factor-induced natural killer cell death as well as IFN $\gamma$  and IL6 secretion [34–37]. Therefore, immunomodulatory and survival effects of CNTF could be mediated through the binding of sortilin.

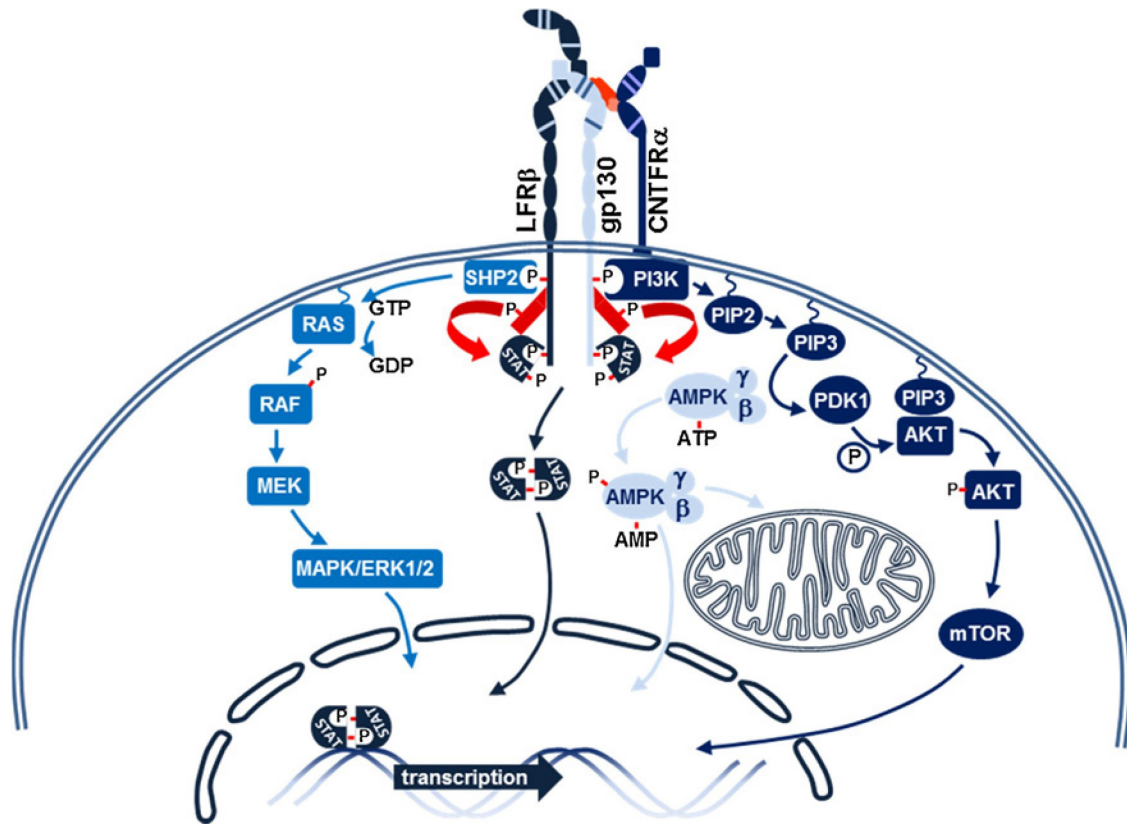




**Fig. 3. CNTF receptors are composed of a non-signaling alpha chain and two signaling chains LIFR $\beta$  and gp130.** Its main receptor is composed of glycosylphosphatidylinositol-anchored chain CNTFR $\alpha$ , but CNTF can also activate a tripartite receptor comprising IL6R $\alpha$ /gp130/LIFR $\beta$ . Alternatively, sortilin can recruit CNTF at cell surface and trigger the activation of gp130 and LIFR $\beta$ . Furthermore, circulating CNTF can bind soluble CNTFR $\alpha$  or IL6R $\alpha$  to form a complex that activates gp130 and LIFR $\beta$  by trans-signaling.

CNTF, like many cytokines of the IL6 family, mainly activates the JAK/STAT pathway (Fig. 4). More specifically, CNTF activates JAK1, JAK2 and TYK2 tyrosine kinases which phosphorylate STAT3 tyrosine in position 705 [38–42]. Phosphorylated STAT3 induces formation of STAT3 dimer that can translocate into the nucleus and initiates gene transcription (Fig. 4). STAT3 induces the transcription of specific target sequence responsible for neuroprotective properties of CNTF, neurite outgrowth and neuronal migration [43–45]. To a lesser extent, CNTF can also activate STAT1 and 5A, mitogen-activated protein kinases (MAPK), extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), AMP-activated protein kinase (AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR) and AKT pathways (Fig. 4) [46–48]. CNTF induced PI3K/Akt pathway was shown to be important in survival and neurite growth of neuroblastoma cells and responsible for CNTF effect on skeletal muscle glucose uptake [49–51]. MAPK-ERK1/2 pathway was demonstrated to play an important role in CNTF induced

neuronal survival in stationary hypothalamic cultures [50]. Whereas STAT3 phosphorylation can be regulated by mTOR, CNTF activation of MAPK-ERK1/2 appears to be mediated through JAK2-dependent Ras and Raf activation [52].



**Fig. 4. Main signaling pathways activated by CNTF.** CNTF-induced heterodimerization of gp130 and LFR $\beta$  triggers trans-phosphorylation and activation of tyrosine kinases JAK1, JAK2 and TYK2. Activated JAKs induces STAT1/3/5A phosphorylation, leading to STATs homo or heterodimerisation, translocation to nucleus and activation of gene transcription. CNTF-elicited activation of JAKs also induces PI3K phosphorylation leading to PDK1 activation and subsequently AKT phosphorylation. Phosphorylated AKT induces mTOR activation leading to upregulation of survival and proliferation. Alternatively, activated JAKs can phosphorylate SHP2 inducing a step-wise activation of Ras, Raf, MEK and ERK 1 or 2. ERK1/2 potentiates the signaling of transcription factors such as STATs. Finally, activated JAKs can directly recruit and activate AMPK, where AMP-AMPK can translocate to the nucleus to regulate gene transcription or increases mitochondrial activity.

#### 4. CNTF neuroprotective properties

CNTF is one of the most extensively studied neurotrophic factor with the ability to induce neuronal cell differentiation, neurite outgrowth, and sustain cell viability (Fig. 1). Neuroprotective properties of CNTF have first been demonstrated by its potent pro-survival effect on chick ciliary ganglion neurons cultures [53,54]. The neurocytokine was then shown to prevent the degeneration of rat motor neuron after axotomy [55]. The next year, exogenous CNTF was shown to prolong survival of chick embryonic spinal motoneurons in culture [56]. CNTF was also demonstrated to contribute to the development of type-2 astrocytes from O-2A glial progenitor cells [57]. Beside its roles in the peripheral nervous system, CNTF also exerts important effects in the central nervous system. Central administration of CNTF prevents retrograde death of rat anterior thalamic neurons [58]. In the same line, it was observed that CNTF inhibits degeneration and atrophy of injured cholinergic and neostriatal medial septum neurons [59].

Central and peripheral neuroprotective effects of CNTF led to preclinical investigations in neurodegenerative diseases such as Huntington's diseases [60–62]. Therefore, implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts were tested in rodent models of Huntington's disease [63]. Vector containing a cDNA sequence coding for a signal peptide-hCNTF fusion was transfected into the baby hamster kidney fibroblast (BHK) cell line. Transfectants were encapsulated in a porous polymer allowing diffusion of the neurotrophic factor in the host while preventing its destruction by the immune system. BHK-hCNTF transplantation in rat lateral ventricles led to a significant reduction of whole body rotations and motor asymmetry induced by quinolinic acid. Huntington's disease results from the degeneration of striatal neurons with the GABAergic neurons being the most affected. BHK-hCNTF implants protected rats from the degeneration of cholinergic and GABAergic immunoreactive striatal neurons. Of note, BHK-hCNTF did not prevent the loss of NADPH-positive neurons in the rat striatum [63]. The protective effect of CNTF on GABAergic neurons in murine models indicated that encapsulated cells secreting CNTF represented promising avenue for Huntington's disease therapy. Preclinical studies of CNTF local administration in a non-human primate model of Huntington's

disease were performed [61]. Like in the murine models, encapsulated hCNTF-producing cells were found to exert a neuroprotective effect in several striatal neurons populations including GABAergic neurons in cynomolgus monkeys following administration of quinolinic acid [61].

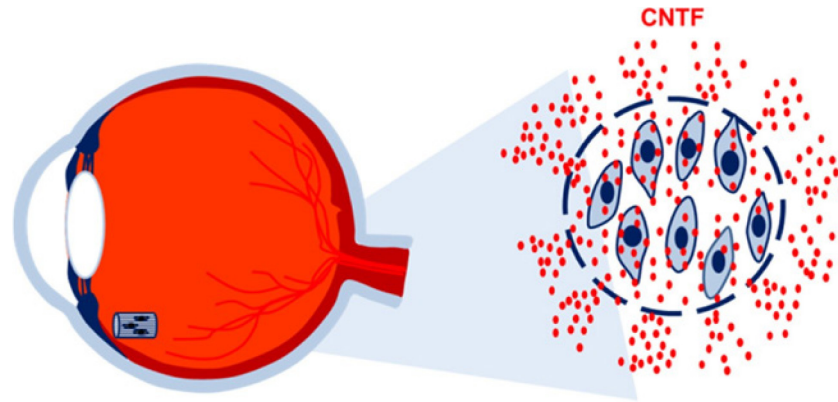
A two-year phase I study with encapsulated BHK-hCNTF was undertaken with 6 subjects with stage 1 or 2 of Huntington's disease [64,65]. The study confirmed the safety and tolerability of the gene therapy but efficacy was limited. Brief survival of the transfectants in the polymeric device decreased the release of CNTF. Improvements in electrophysiological parameters correlated with the remaining CNTF secretion capacity of the implants at the time of explantation [64]. These results suggest a therapeutic potential of the neurotrophic factor in Huntington's disease treatment although the efficacy and stability of the gene therapy procedure need to be improved.

Recombinant human CNTF (rhCNTF) was also considered for the treatment of ALS. ALS is predominately a sporadic neurodegenerative disease affecting spinal motor neurons rapidly leading to paralysis and dysfunction in the respiratory system. Some studies suggest that CNTF null mutation increases the probability to develop or accelerate motor neuron degenerative diseases such as ALS but this remains a subject of controversy. However, regional expression of CNTF is modulated in ALS rodent models and patients [66,67]. Post-mortem tissue analysis of ALS patients reported a significant decrease in CNTF expression in the ventral and dorsal spinal cord [68]. Furthermore, increased CNTF levels were observed in the serum of patients with moderate and severe states of ALS [69,70]. Pre-clinical and clinical studies were undertaken in the late 1990 to evaluate the neuroprotective potential of recombinant hCNTF administration in ALS patients [71,72]. In the phase II study, 570 patients with ALS were followed in a placebo-controlled study evaluating the effect of daily subcutaneous administration of hCNTF (placebo, 0.5, 2, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) over 6 months [72]. At all doses tested, hCNTF did not show beneficial effect on pulmonary function, motility or survival. The treatment inefficacy was suggested to be due to a sub-therapeutic dose administration, a defect in reaching neuromuscular junctions or an inactivation mediated by blocking antibodies. Also, dose related adverse effects were observed including, injection site reaction, nausea, fatigue, anorexia and increased death rates (highest dosage) [72]. Some of the adverse effects could be

explained by the ability of CNTF to activate cells expressing gp130, LIFR $\beta$  and IL6R $\alpha$  (Fig. 3), as IL-6R $\alpha$  expression is more ubiquitous in peripheral cells than CNTFR $\alpha$  expression. To overcome peripheral adverse effects of CNTF and to ensure CNTF delivery to the brain, intrathecal implantation of encapsulated BHK-hCNTF transfectants was suggested as an alternative therapeutic strategy and tested in ALS patients in a phase I study [73,74].

CNTF-induced neuroprotective effects extend to retinal cells (Fig. 1). Like brain-derived neurotrophic factor, interleukin 1 $\beta$  and insulin-growth factor, intravitreal injections of CNTF in rats rescue photoreceptors degeneration induced by constant light [75]. CNTF also induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration [76]. Furthermore, CNTF was found to promote survival and differentiation of multipotent human retinal cell progenitors [77]. Hence, CNTF has shown to be beneficial for retinal degeneration in more than 12 animal models from 4 different species [78]. These observations suggested CNTF as a trophic agent for the treatment of age-related macular degeneration (AMD), geographic atrophy and human retinitis pigmentosa. To avoid secondary effects previously observed in clinical studies with systemic recombinant CNTF administration and to bypass the blood-retinal barrier that could prevent its penetration from the circulation, a strategy based on a direct local delivery of the neurocytokine was selected. The latter bears similarities with the approach previously tested in the treatment of Huntington's disease and ALS using local delivery by intrathecal implantation of encapsulated BHK-secreting CNTF cells: Encapsulated human retinal pigment epithelium (RPE) cells genetically modified to secrete CNTF are injected in the vitreous cavity (Fig. 5) [79]. A phase 2 clinical study was performed to assess safety and efficacy of CNTF intraocular delivery for treatment of geographic atrophy, using NT-501 implants (Neurotech, Lincoln, RI) secreting CNTF at a medium rate of  $1.6 \pm 0.7$  ng/day, corresponding to doses previously shown to protect photoreceptors in dog model of retinal degeneration animals studies [80–82]. Six-month long treatment with NT-501 resulted in an increase in retinal thickness, improvement in best corrected visual acuity, and slower progression of vision loss [82]. These results suggest that implantation of encapsulated CNTF-producing RPE cells is a promising therapeutic strategy in the treatment of retinal degenerative diseases. Thanks to results of these preclinical and clinical studies, NT-501 was granted orphan drug designation by the FDA for

retinitis pigmentosa and macular telangiectasia as well as fast-track designation for retinitis pigmentosa and dry age-related macular degeneration.



**Fig. 5. Schematic illustration of intraocular NT-501 implants.** Neurotech’s technology allows local injections of encapsulated CNTF-producing cells in the vitreous cavity of the eye. NT-501 implants are made of retinal pigment epithelial cells genetically engineered to secrete human CNTF. Cells are encapsulated in a semi-permeable polymer containing pores sized to allow CNTF while preventing immune cells attack.

Modified from Neurotech’s web site (<http://www.neurotechusa.com/>).

## 5. CNTF effect on neuroinflammation

CNTF promotes oligodendrocytes survival in culture and counter oligodendrocytes apoptosis induced by tumor necrosis factors [83]. CNTF also exert promyelinating effects in neuron-oligodendrocyte co-cultures by enhancing oligodendrocyte maturation [84]. In an acute rodent model of demyelination, CNTF was shown to regulate mobilization and migration of neural progenitor cells responsible for myelin regeneration toward the demyelinated site [85]. Furthermore, CNTF<sup>-/-</sup> mice develop earlier symptoms and more severe disabilities in myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide-induced experimental autoimmune

encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis (MS) [86]. CNTF's role in demyelinating disorders such as multiple sclerosis was therefore investigated. MS is an autoimmune demyelinating disease resulting in oligodendrocyte loss, reactive astrocytes, axonal pathology and chronic neuroinflammation induced by infiltrating immune cells. Chronic CNTF administration was tested in MOG35-55 induced EAE mouse model [87]. Daily CNTF intraperitoneal injections produced a decrease in infiltrating immune cells and enhanced the numbers of neurons and oligodendrocytes correlating with reduction of EAE symptoms. Indeed, ~78% of the saline treated mice reached a clinical score of 3 or more, whereas only ~20% of CNTF treated-mice reached a score of 2 or more, suggesting important neuroprotection properties for the trophic factor in EAE [87]. In an independent study, beneficial effects of CNTF were demonstrated by intravenous injections of CNTF-EGFP expressing mesenchymal stem cell into MOG35-55-EAE mice. Mice treated with MSC-CNTF-EGFP showed a marked increase in neuronal functional recovery and enhanced level of the immunosuppressive cytokine IL10 in peripheral blood compared to MSC-GFP treated mice [88]. The exact mechanism by which CNTF exert beneficial effects in MOG35-55-EAE MS rodent model is still unclear. However, it is believed that CD4<sup>+</sup> T cells subsets are key players in MS, with IL-17 producing cells playing a detrimental role while T cells IFN $\gamma$  production is required for IFN $\beta$  protective effects [89,90]. CNTF was recently shown to trigger IFN $\gamma$  secretion in cultured CD4<sup>+</sup> T cells but did not influence IL-17 production [91]. It remains to be determined whether CNTF-induced IFN $\gamma$  expression contributes to beneficial effect of CNTF treatment in EAE rodent model and whether CNTF administration could be beneficial in relapsing-remitting forms of MS.

## 6. CNTF in neurogenesis

Centrally administered CNTF induces neuronal proliferation in mouse hypothalamic region controlling food intake [92]. Unlike leptin-treated mice, CNTF-treated mice maintained a sustainable weight loss long after CNTF treatment was stopped. This effect was specifically inhibited by mitogenic blockers suggesting a role of neurogenesis in the long-term anorectic effect of CNTF. Furthermore, the hypothalamic proliferative neuronal cells were shown to express CNTFR implying that CNTF could promote neuronal stem cell division directly through

its receptor [92]. Together, these results raised an interest the potential role of CNTF in neurogenesis. In 2003, using neutralizing CNTF antibodies, Emlsey and Hagg, demonstrated that endogenous CNTF, alike exogenous CNTF, promotes neurogenesis in adult mice [93]. This study also established that CNTF preferentially promotes neuronal stem cells progenitor differentiation in neurons rather than astrocytes or oligodendrocytes in mouse dentate gyrus [93]. In parallel, CNTF was found to counteract the effect of a powerful neurogenesis inhibitor, fibroblast growth factor-2 (FGF2). Of note, FGF2 is markedly increased in Alzheimer's disease (AD) resulting in an observable reduction in neurogenesis [94]. A CNTF derived peptide (peptide 6) with similar biological activities was tested in A $\beta$ PP transgenic mice, an established rodent model of AD. Peptide 6 administration led to increased numbers of neuroblasts and proliferative neuronal cells [95]. These results suggest that CNTF-induced neurogenesis might represent a promising therapeutic target in AD.

A recent study demonstrated the importance of CNTF in neurogenesis following focal brain ischemia [96]. C57/BL6 mice undergoing middle cerebral artery occlusion react with strong neurogenesis in the subventricular zone. A three-fold increase in CNTF expression was observed in the subventricular zone by day 5 after the artery occlusion, correlating with neuronal proliferation. In CNTF knockout mice, stroke-induced neuronal proliferation was significantly reduced. Interestingly, in contrast to what was observed in the eye, LIF or IL6 does not seem to compensate the loss of neurogenesis in CNTF<sup>-/-</sup> mice following focal ischemia suggesting a non-redundant role of CNTF in the subventricular zone [96].

CNTF and its receptor are expressed in spinal neurosphere cultures that comprise neuronal stem cells and progenitors. More specifically, mild CNTF expression correlated with stem cell expansion while CNTF levels were highly increased during cell differentiation [97]. Studies with adult and embryonic spinal neurospheres derived from CNTF knockout mice indicate a role of endogenous CNTF in astrocyte differentiation and, unexpectedly, a role in negative regulation of neurosphere expansion through increase cell death rate [97]. Since neurospheres are now widely considered for biotherapy of neurodegenerative diseases and spinal cord injury, understanding the effect CNTF on neurospheres is likely to be relevant for a better therapeutic outcome.



## 7. CNTF metabolic effect

Systemic CNTF administration during clinical trials resulted in unexpected substantial weight loss in patients [71]. This observation triggered numerous investigations on the potential of this cytokine for the treatment of metabolic syndrome pathologies such as obesity and type II diabetes. CNTFR was found to be expressed in mouse hypothalamic nuclei, the region of the brain where energy balance is controlled [98]. CNTF intraperitoneal injections in genetically- (ob/ob; deficient for the gene coding for leptin) and diet-induced obese mice led to a dose-dependent weight loss and decrease in food intake, suggesting that CNTF can overcome leptin resistance [98,99]. Furthermore, CNTF reversed the hyperglycemia and hyperinsulinemia in ob/ob mice, indicating that CNTF could be beneficial in obesity-induced metabolic diseases [98]. The anorectic effect of CNTF was suggested to be due to a hypothalamic inhibition of the neuropeptide Y (NPY), an endogenous orexigenic signal [100]. CNTF reduces NPY supply for release and suppress its action on target hypothalamic sites [100]. Long-term anorectic effect of CNTF in animal seems to be the result of CNTF's neurogenesis effect in the hypothalamus [92]. Beside its central effect on satiety, the neurotrophic factor can act directly in periphery to modulate energy metabolism. CNTFR $\alpha$  was shown to be expressed in adipocytes, and CNTFR $\alpha$  RNA levels are up regulated in genetically obese mice [101]. CNTF induces STAT3 phosphorylation in cultured 3T3-L1 adipocytes and rodent adipocytes (Fig. 1) [101]. In preadipocytes, CNTF was shown to trigger the AKT pathway, whereas in mature adipocytes MAPK-Erk1/2 activation was observed. Unlike exposure to inflammatory cytokines, CNTF treatment does not increase the transcription factors PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  levels but increases insulin sensitivity by up regulating Glucose-transporter-4 (Glut4) and Insulin-receptor subunit-1 (IRS-1) expression in cultured adipocytes [101]. Functionally, studies on brown adipocytes indicated that CNTF could regulate energy homeostasis by enhancing  $\beta$ -adrenergic stimulation of uncoupling protein-1 (UCP1), the protein responsible for producing heat instead of ATP [102].

In obesity and obesity-mediated metabolic diseases, impaired insulin signaling in skeletal muscle is observed linked to chronic inflammation and lipid accumulation. Skeletal muscles

express the heterotrimeric CNTF receptor and glucose uptake is regulated through PI3K/AKT and AMPK signaling pathway. Hence, CNTF activates AMPK and PI3/AKT in muscles, increases lipid oxidation as well as Glut4 expression, strongly suggesting a role for CNTF in the regulation of glucose uptake. CNTF treatment in mice reduces blood glucose concentration and increased glucose uptake in lean mice skeletal muscle via the activation of PI3K/AKT [51]. Surprisingly, CNTF-induced glucose uptake in lean mice was shown to be less dependent of AMPK activation [51]. Anorectic effects of CNTF were diminished by 50% in insulin-resistant rodent model explained by the suppression of CNTF-induced AKT phosphorylation. Despite these data, CNTF remains a promising target in metabolic diseases since it maintains lipid oxidation as well as STAT3 and AMPK activation in skeletal muscle of obese mice [103].

Axokine (Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY) is a recombinant variant of human CNTF (rvhCNTF). In Axokine, the last carboxy 15 amino acids are truncated, cysteine at position 17 is replaced by alanine and, glutamine at position 63 is replaced by arginine to increase stability and potency [104]. Axokine was tested in a phase II clinical study to evaluate the anti-obesity potential of CNTF. One hundred seventy-three randomized patients underwent a 12 weeks study evaluating weight loss according to daily subcutaneous injections of 0, 0.3, 1.0 or 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of rvhCNTF. A dose-related significant weight loss was observed in the rhvCNTF treated group. Treatment with 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of Axokine procured the maximum effect resulting in a 4.0 kg weight loss, representing a minimum of 5% change in total body weight for 30% of the patients. Kilogram-range changes were observed upon 12 months after treatment but no significant differences in weight were observable over 1-year post-treatment compared to placebo [105]. Axokine treatment resulted in numerous side effects similar to the ones noted with phase II study in ALS. Among others, nausea, injection-site reactions and musculoskeletal pain were observed. More importantly, Axokine injection led to the development of binding and neutralizing anti-rhvCNTF antibodies [105]. Due to important adverse effects and lack of long-term beneficial effect, Regeneron abandoned Axokine treatment for obesity.

## 8. CNTF effect on bone

Bone remodeling is a continuous renewing process in which damaged bone is resorbed by osteoclasts and while osteoblasts induce formation of new bone tissue. Gp130 cytokines are highly expressed in bone remodeling units and are known to play a key role in maintaining balance between bone formation and resorption. Cytokine expressed by skeletal muscles can regulate bone metabolism by accessing the outer surface of cortical bone through the periosteum [106]. Alternatively, immunohistochemistry assays revealed the presence of CNTF in osteoblasts, osteocytes, osteoclasts and chondrocytes suggesting a role for this cytokine in bone metabolism. *In vitro* studies suggested that CNTF does not affect osteocyte or osteoclast metabolism but inhibits bone mineralization by osteoblasts (Figure 1) [2]. *In vitro*, CNTF alone or in combination with soluble CNTFR $\alpha$  inhibits differentiation of mouse primary calvarial osteoblasts by reducing gene expression of Sost and Osterix [2,107]. *In vivo*, the lack of CNTF in mice results in an increased number of osteoblasts [107]. Furthermore, CNTF<sup>-/-</sup> mice present different bone characteristics between genders, suggesting a possible interaction of CNTF with steroid hormones. While male CNTF<sup>-/-</sup> mice show reduced femoral length and periosteal circumference, female CNTF<sup>-/-</sup> mice show increased tibial trabecular bone volume as well as trabecular number and thickness [107]. These observations indicate a role for CNTF in male cortical growth and as an inhibitor of trabecular bone formation in female.

## 9. Conclusion and clinical perspectives

CNTF is a neurotrophic factor with promising benefits in a wide range of pathologies. As described above, CNTF exerts beneficial effects in animal models of neurodegenerative diseases, spinal cord injuries, retinal degeneration, autoimmune neuroinflammation and obesity-related metabolic diseases (Fig. 1). Although CNTF treatment led to dose-dependent improvements in several clinical studies, the neurocytokine administration also resulted in important peripheral side effects. Promising genetic therapies have been developed to overcome side effects of injections such as the NT-501 technology for the treatment of retinal diseases (now on FDA fast track designation). However, procedures involving local injections can only be considered for a limited number of pathologies, revealing the need to pursue development of

CNTF systemic administration therapeutic strategies with lower side effects. In regard to the restricted CNTFR $\alpha$  expression pattern, it is generally accepted that CNTF peripheral adverse effects are linked to the activation of the IL6R $\alpha$ -LIFR $\beta$ -gp130 receptor. Dr. Scheller's laboratory along with collaborators has recently described a CNTF variant specific for CNTFR $\alpha$  [108]. This CNTF variant was generated by exchanging amino acids from cardiotrophin-like cytokine and CNTF site I, resulting in a R28E CNTF mutant. This CNTFR selective CNTF could be a promising therapeutic tool for anti-obesity and obesity-induced metabolic treatment, alone or in conjunction with agents that would prevent CNTF trans-signaling. Furthermore this CNTF variant will help to decipher CNTFR $\alpha$  vs. IL6R $\alpha$  mediated effects of CNTF. The specificity of CNTF could be further enhanced by conjugating the use of CNTFR mutants that are specific for modified soluble CNTFR $\alpha$  derivatives targeted to cells expressing gp130-LIFR $\beta$  and a particular cell surface marker, using the "designer cytokine" approach pioneered by Regeneron Pharmaceuticals, Inc [109].

#### **Conflict of interest**

None declared.

#### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; J-FG; MOP-57832). SP was supported by a fellowship from the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship-Masters (CGS M) CIHR. MS received support in part from the Department of Veterans Affairs, Veterans Health Administration, Office of Research and Development (VABX001037) and MBRF, KCVVA Medical Center, Kansas City, MO, USA.

We apologize to all investigators whose work could not be cited due to the scope of the subject and space limitations.

## References

- [1] S.D. Skaper, I. Selak, M. Manthorpe, S. Varon, Chemically defined requirements for the survival of cultured 8-day chick embryo ciliary ganglion neurons, *Brain Res.* 302 (1984) 281–290.
- [2] R.W. Johnson, J.D. White, E.C. Walker, T.J. Martin, N.A. Sims, Myokines (muscle-derived cytokines and chemokines) including ciliary neurotrophic factor (CNTF) inhibit osteoblast differentiation, *Bone* 64 (2014) 47–56.
- [3] A. Lam, F. Fuller, J. Miller, J. Kloss, M. Manthorpe, S. Varon, et al., Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor, *Gene* 102 (1991) 271–276.
- [4] L.F. Lin, D. Mismar, J.D. Lile, L.G. Armes, E.T. Butler 3rd, J.L. Vannice, et al., Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF), *Science* 246 (1989) 1023–1025.
- [5] M. Manthorpe, S.D. Skaper, L.R. Williams, S. Varon, Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neuronotrophic factor, *Brain Res.* 367 (1986) 282–286.
- [6] N.Q. McDonald, N. Panayotatos, W.A. Hendrickson, Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing, *EMBO J.* 14 (1995) 2689–2699.
- [7] N. Panayotatos, E. Radziejewska, A. Acheson, R. Somogyi, A. Thadani, W.A. Hendrickson, et al., Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 14007–14014.
- [8] N. Dagonneau, D. Scheffer, C. Huber, L.I. Al-Gazali, M. Di Rocco, A. Godard, et al., Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve–Wiedemann/Schwartz–Jampel type 2 syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 298–305.
- [9] K.A. Stockli, L.E. Lillien, M. Naher-Noe, G. Breitfeld, R.A. Hughes, M.C. Raff, et al., Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain, *J. Cell Biol.* 115 (1991) 447–459.
- [10] C. Dallner, A.G. Woods, T. Deller, M. Kirsch, H.D. Hofmann, CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain, *Glia* 37 (2002) 374–378.

- [11] K.A. Stockli, F. Lottspeich, M. Sendtner, P. Masiakowski, P. Carroll, R. Gotz, et al., Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor, *Nature* 342 (1989) 920–923.
- [12] R.W. Oppenheim, D. Prevette, Q.W. Yin, F. Collins, J. MacDonald, Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor, *Science* 251 (1991) 1616–1618.
- [13] F. Dittrich, H. Thoenen, M. Sendtner, Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat, *Ann. Neurol.* 35 (1994) 151–163.
- [14] The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I–II Study, *Clin. Neuropharmacol.* 18 (1995) 500–514.
- [15] S. Davis, T.H. Aldrich, N. Stahl, L. Pan, T. Taga, T. Kishimoto, et al., LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor, *Science* 260 (1993) 1805–1808.
- [16] N.Y. Ip, J. McClain, N.X. Barrezueta, T.H. Aldrich, L. Pan, Y. Li, et al., The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development, *Neuron* 10 (1993) 89–102.
- [17] S. Davis, T.H. Aldrich, D.M. Valenzuela, V.V. Wong, M.E. Furth, S.P. Squinto, et al., The receptor for ciliary neurotrophic factor, *Science* 253 (1991) 59–63.
- [18] N. Stahl, G.D. Yancopoulos, The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines, *J. Neurobiol.* 25 (1994) 1454–1466.
- [19] W.A. Beltran, Q. Zhang, J.W. Kijas, D. Gu, H. Rohrer, J.A. Jordan, et al., Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha), *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 44 (2003) 3642–3649.
- [20] S. Fuhrmann, K. Grabosch, M. Kirsch, H.D. Hofmann, Distribution of CNTF receptor alpha protein in the central nervous system of the chick embryo, *J. Comp. Neurol.* 461 (2003) 111–122.
- [21] F.C. Ip, A.K. Fu, K.W. Tsim, N.Y. Ip, Cloning of the alpha component of the chick ciliary neurotrophic factor receptor: developmental expression and down-regulation in denervated skeletal muscle, *J. Neurochem.* 65 (1995) 2393–2400.

- [22] N. Panayotatos, D. Everdeen, A. Liten, R. Somogyi, A. Acheson, Recombinant human CNTF receptor alpha: production, binding stoichiometry, and characterization of its activity as a diffusible factor, *Biochemistry* 33 (1994) 5813–5818.
- [23] S. Davis, T.H. Aldrich, N.Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, et al., Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses, *Science* 259 (1993) 1736–1739.
- [24] C. Monville, M. Couplier, L. Conti, C. De-Fraja, P. Dreyfus, C. Fages, et al., Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor, *Mol. Cell. Neurosci.* 17 (2001) 373–384.
- [25] D.P. Gearing, S.F. Ziegler, M.R. Comeau, D. Friend, B. Thoma, D. Cosman, et al., Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 1119–1123.
- [26] B. Schuster, M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grotzinger, et al., Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9528–9535.
- [27] J.V. Larsen, M. Hansen, B. Moller, P. Madsen, J. Scheller, M. Nielsen, et al., Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 4175–4187.
- [28] E.M. Quistgaard, P. Madsen, M.K. Groftehauge, P. Nissen, C.M. Petersen, S.S. Thirup, Ligands bind to Sortilin in the tunnel of a ten-bladed beta-propeller domain, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (2009) 96–98.
- [29] C.M. Petersen, M.S. Nielsen, A. Nykjaer, L. Jacobsen, N. Tommerup, H.H. Rasmussen, et al., Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 3599–3605.
- [30] P. Linsel-Nitschke, J. Heeren, Z. Aherrahrou, P. Bruse, C. Gieger, T. Illig, et al., Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease, *Atherosclerosis* 208 (2010) 183–189.

- [31] A. Nykjaer, R. Lee, K.K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M.S. Nielsen, et al., Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death, *Nature* 427 (2004) 843–848.
- [32] A. Nykjaer, T.E. Willnow, Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function, *Trends Neurosci.* 35 (2012) 261–270.
- [33] H.K. Teng, K.K. Teng, R. Lee, S. Wright, S. Tevar, R.D. Almeida, et al., ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin, *J. Neurosci.* 25 (2005) 5455–5463.
- [34] A.L. Fauchais, F. Lalloue, M.C. Lise, A. Boumediene, J.L. Preud'homme, E. Vidal, et al., Role of endogenous brain-derived neurotrophic factor and sortilin in B cell survival, *J. Immunol.* 181 (2008) 3027–3038.
- [35] M.L. Rogers, S. Bailey, D. Matusica, I. Nicholson, H. Muyderman, P.C. Pagadala, et al., ProNGF mediates death of Natural Killer cells through activation of the p75NTR-sortilin complex, *J. Neuroimmunol.* 226 (2010) 93–103.
- [36] S. Herda, F. Raczkowski, H.W. Mittrucker, G. Willimsky, K. Gerlach, A.A. Kuhl, et al., The sorting receptor Sortilin exhibits a dual function in exocytic trafficking of interferon-gamma and granzyme A in T cells, *Immunity* 37 (2012) 854–866.
- [37] M.B. Mortensen, M. Kjolby, S. Gunnarsen, J.V. Larsen, J. Palmfeldt, E. Falk, et al., Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 5317–5322.
- [38] N. Stahl, T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, et al., Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science* 263 (1994) 92–95.
- [39] N. Stahl, T.J. Farruggella, T.G. Boulton, Z. Zhong, J.E. Darnell Jr., G.D. Yancopoulos, Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors, *Science* 267 (1995) 1349–1353.
- [40] C. Luttkien, U.M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, et al., Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science* 263 (1994) 89–92.
- [41] M. Narazaki, B.A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J.N. Ihle, et al., Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 2285–2289.



- [42] D. Guschin, N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, et al., A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *EMBO J.* 14 (1995) 1421–1429.
- [43] A. Bonni, D.A. Frank, C. Schindler, M.E. Greenberg, Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus, *Science* 262 (1993) 1575–1579.
- [44] U.M. Wegenka, C. Luttkien, J. Buschmann, J. Yuan, F. Lottspeich, W. Muller-Esterl, et al., The interleukin-6-activated acute-phase response factor is antigenically and functionally related to members of the signal transducer and activator of transcription (STAT) family, *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 3186–3196.
- [45] C.F. Lai, J. Ripperger, K.K. Morella, Y. Wang, D.P. Gearing, N.D. Horseman, et al., STAT3 and STAT5B are targets of two different signal pathways activated by hematopoietin receptors and control transcription via separate cytokine response elements, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23254–23257.
- [46] T.G. Boulton, N. Stahl, G.D. Yancopoulos, Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11648–11655.
- [47] W.P. Schiemann, L.M. Graves, H. Baumann, K.K. Morella, D.P. Gearing, M.D. Nielsen, et al., Phosphorylation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) receptor by mitogen-activated protein kinase and the regulation of LIF receptor function by heterologous receptor activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 5361–5365.
- [48] M. Leibinger, A. Andreadaki, D. Fischer, Role of mTOR in neuroprotection and axon regeneration after inflammatory stimulation, *Neurobiol. Dis.* 46 (2012) 314–324.
- [49] K. Wang, F. Zhou, X. Zhu, K. Zhang, B. Huang, L. Zhu, et al., Neuroprotective properties of ciliary neurotrophic factor on retinoic acid (RA)-predifferentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Folia Neuropathol.* 52 (2014) 121–127.
- [50] J.M. Askvig, J.A. Watt, The MAPK and PI3K pathways mediate CNTF-induced neuronal survival and process outgrowth in hypothalamic organotypic cultures, *J. Cell Commun. Signal.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-015-0268-8>.

- [51] G.R. Steinberg, M.J. Watt, M. Ernst, M.J. Birnbaum, B.E. Kemp, S.B. Jorgensen, Ciliary neurotrophic factor stimulates muscle glucose uptake by a PI3-kinase- dependent pathway that is impaired with obesity, *Diabetes* 58 (2009) 829–839.
- [52] K. Yokogami, S. Wakisaka, J. Avruch, S.A. Reeves, Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR, *Curr. Biol.* 10 (2000) 47–50.
- [53] U. Ernsberger, M. Sendtner, H. Rohrer, Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor, *Neuron* 2 (1989) 1275–1284.
- [54] Y. Arakawa, M. Sendtner, H. Thoenen, Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines, *J. Neurosci.* 10 (1990) 3507–3515.
- [55] M. Sendtner, G.W. Kreutzberg, H. Thoenen, Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy, *Nature* 345 (1990) 440–441.
- [56] M. Sendtner, Y. Arakawa, K.A. Stockli, G.W. Kreutzberg, H. Thoenen, Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival, *J. Cell Sci. Suppl.* 15 (1991) 103–109.
- [57] S.M. Hughes, L.E. Lillien, M.C. Raff, H. Rohrer, M. Sendtner, Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture, *Nature* 335 (1988) 70–73.
- [58] R.E. Clatterbuck, D.L. Price, V.E. Koliatsos, Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 2222–2226.
- [59] T. Hagg, D. Quon, J. Higaki, S. Varon, Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS, *Neuron* 8 (1992) 145–158.
- [60] K.D. Anderson, N. Panayotatos, T.L. Corcoran, R.M. Lindsay, S.J. Wiegand, Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996) 7346–7351.
- [61] D.F. Emerich, S.R. Winn, P.M. Hantraye, M. Peschanski, E.Y. Chen, Y. Chu, et al., Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington’s disease, *Nature* 386 (1997) 395–399.

- [62] L.P. de Almeida, D. Zala, P. Aebischer, N. Deglon, Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease, *Neurobiol. Dis.* 8 (2001) 433–446.
- [63] D.F. Emerich, M.D. Lindner, S.R. Winn, E.Y. Chen, B.R. Frydel, J.H. Kordower, Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease, *J. Neurosci.* 16 (1996) 5168–5181.
- [64] J. Bloch, A.C. Bachoud-Levi, N. Deglon, J.P. Lefaucheur, L. Winkel, S. Palfi, et al., Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study, *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 968–975.
- [65] A.C. Bachoud-Levi, N. Deglon, J.P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, et al., Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 1723–1729.
- [66] S. Ono, T. Imai, A. Igarashi, N. Shimizu, H. Nakagawa, J. Hu, Decrease in the ciliary neurotrophic factor of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis, *Eur. Neurol.* 42 (1999) 163–168.
- [67] D.A. Lee, L. Gross, D.A. Wittrock, A.J. Windebank, Localization and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in postmortem sciatic nerve from patients with motor neuron disease and diabetic neuropathy, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 915–923.
- [68] P. Anand, A. Parrett, J. Martin, S. Zeman, P. Foley, M. Swash, et al., Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease, *Nat. Med.* 1 (1995) 168–172.
- [69] H. Laaksovirta, S. Soinila, V. Hukkanen, M. Roytta, M. Soilu-Hanninen, Serum level of CNTF is elevated in patients with amyotrophic lateral sclerosis and correlates with site of disease onset, *Eur. J. Neurol.* 15 (2008) 355–359.
- [70] J. Ilzecka, Increased serum CNTF level in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Eur. Cytokine Netw.* 14 (2003) 192–194.
- [71] R.G. Miller, W.W. Bryan, M.A. Dietz, T.L. Munsat, J.H. Petajan, S.A. Smith, et al., Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Neurology* 47 (1996) 1329–1331.

- [72] R.G. Miller, J.H. Petajan, W.W. Bryan, C. Armon, R.J. Barohn, J.C. Goodpasture, et al., A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group, *Ann. Neurol.* 39 (1996) 256–260.
- [73] P. Aebischer, N.A. Pochon, B. Heyd, N. Deglon, J.M. Joseph, A.D. Zurn, et al., Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 851–860.
- [74] P. Aebischer, M. Schluep, N. Deglon, J.M. Joseph, L. Hirt, B. Heyd, et al., Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients, *Nat. Med.* 2 (1996) 696–699.
- [75] M.M. LaVail, K. Unoki, D. Yasumura, M.T. Matthes, G.D. Yancopoulos, R.H. Steinberg, Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 11249–11253.
- [76] Y. Li, W. Tao, L. Luo, D. Huang, K. Kauper, P. Stabila, et al., CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration, *PLoS ONE* 5 (2010) e9495.
- [77] K. Dutt, Y. Cao, I. Ezeonu, Ciliary neurotrophic factor: a survival and differentiation inducer in human retinal progenitors, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46 (2010) 635–646.
- [78] R. Wen, W. Tao, Y. Li, P.A. Sieving, CNTF and retina, *Prog. Retin. Eye Res.* 31 (2012) 136–151.
- [79] D.F. Emerich, C.G. Thanos, NT-501: an ophthalmic implant of polymer- encapsulated ciliary neurotrophic factor-producing cells, *Curr. Opin. Mol. Therapeut.* 10 (2008) 506–515.
- [80] K. Kauper, C. McGovern, S. Sherman, P. Heatherton, R. Rapoza, P. Stabila, et al., Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 53 (2012) 7484–7491.
- [81] C.G. Thanos, W.J. Bell, P. O'Rourke, K. Kauper, S. Sherman, P. Stabila, et al., Sustained secretion of ciliary neurotrophic factor to the vitreous, using the encapsulated cell therapy-based NT-501 intraocular device, *Tissue Eng.* 10 (2004) 1617–1622.
- [82] K. Zhang, J.J. Hopkins, J.S. Heier, D.G. Birch, L.S. Halperin, T.A. Albini, et al., Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of

geographic atrophy in age-related macular degeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 6241–6245.

[83] S.D. D'Souza, K.A. Alinauskas, J.P. Antel, Ciliary neurotrophic factor selectively protects human oligodendrocytes from tumor necrosis factor-mediated injury, *J. Neurosci. Res.* 43 (1996) 289–298.

[84] B. Stankoff, M.S. Aigrot, F. Noel, A. Wattilliaux, B. Zalc, C. Lubetzki, Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules, *J. Neurosci.* 22 (2002) 9221–9227.

[85] J. Vernerey, M. Macchi, K. Magalon, M. Cayre, P. Durbec, Ciliary neurotrophic factor controls progenitor migration during remyelination in the adult rodent brain, *J. Neurosci.* 33 (2013) 3240–3250.

[86] R.A. Linker, M. Maurer, S. Gaupp, R. Martini, B. Holtmann, R. Giess, et al., CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation, *Nat. Med.* 8 (2002) 620–624.

[87] T. Kuhlmann, L. Remington, I. Cognet, L. Bourbonniere, S. Zehntner, F. Guillhot, et al., Continued administration of ciliary neurotrophic factor protects mice from inflammatory pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Am. J. Pathol.* 169 (2006) 584–598.

[88] Z. Lu, X. Hu, C. Zhu, D. Wang, X. Zheng, Q. Liu, Overexpression of CNTF in mesenchymal stem cells reduces demyelination and induces clinical recovery in experimental autoimmune encephalomyelitis mice, *J. Neuroimmunol.* 206 (2009) 58–69.

[89] H. Kebir, K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, et al., Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation, *Nat. Med.* 13 (2007) 1173–1175.

[90] R.C. Axtell, B.A. de Jong, K. Boniface, L.F. van der Voort, R. Bhat, P. De Sarno, et al., T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis, *Nat. Med.* 16 (2010) 406–412.

[91] A.J. Tormo, M.C. Letellier, R. Lissilaa, L.A. Batrville, M. Sharma, W. Ferlin, et al., The cytokines cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 (CLC/ CLF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF) differ in their receptor specificities, *Cytokine* 60 (2012) 653–660.

[92] M.V. Kokoeva, H. Yin, J.S. Flier, Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance, *Science* 310 (2005) 679–683.

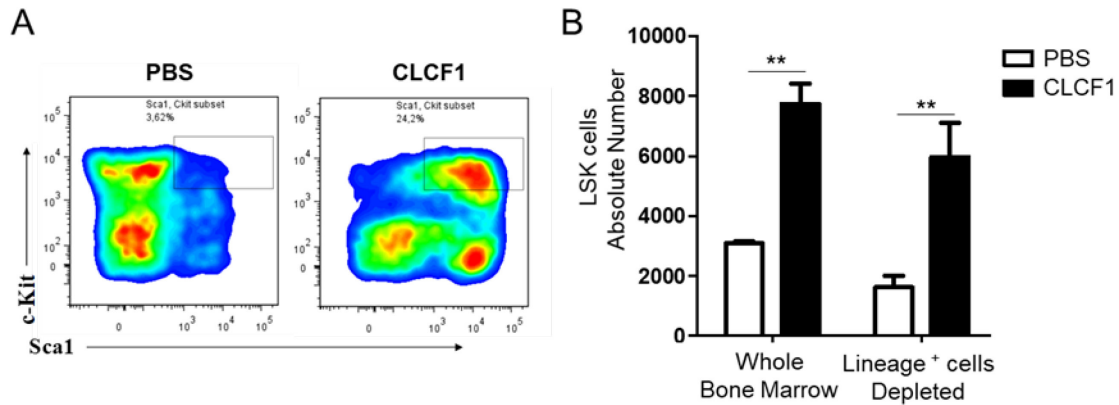
- [93] J.G. Emsley, T. Hagg, Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice, *Exp. Neurol.* 183 (2003) 298–310.
- [94] H. Chen, Y.C. Tung, B. Li, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, Trophic factors counteract elevated FGF-2-induced inhibition of adult neurogenesis, *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 1148–1162.
- [95] E. Rockenstein, K. Ubhi, E. Doppler, P. Novak, H. Moessler, B. Li, et al., Regional comparison of the neurogenic effects of CNTF-derived peptides and cerebrolysin in AbetaPP transgenic mice, *J. Alzheimer's Dis.* 27 (2011) 743–752.
- [96] S.S. Kang, M.P. Keasey, S.A. Arnold, R. Reid, J. Geraldts, T. Hagg, Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice, *Neurobiol. Dis.* 49 (2013) 68–78.
- [97] L. Deleyrolle, S. Marchal-Victorion, C. Dromard, V. Fritz, M. Saunier, J.C. Sabourin, et al., Exogenous and fibroblast growth factor 2/epidermal growth factor-regulated endogenous cytokines regulate neural precursor cell growth and differentiation, *Stem Cells* 24 (2006) 748–762.
- [98] I. Gloaguen, P. Costa, A. Demartis, D. Lazzaro, A. Di Marco, R. Graziani, et al., Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 6456–6461.
- [99] P.D. Lambert, K.D. Anderson, M.W. Sleeman, V. Wong, J. Tan, A. Hijarunguru, et al., Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 4652–4657.
- [100] S. Pu, H. Dhillon, L.L. Moldawer, P.S. Kalra, S.P. Kalra, Y. Neuropeptide, Neuropeptide Y counteracts the anorectic and weight reducing effects of ciliary neurotropic factor, *J. Neuroendocrinol.* 12 (2000) 827–832.
- [101] S. Zvonic, P. Cornelius, W.C. Stewart, R.L. Mynatt, J.M. Stephens, The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 2228–2235.

- [102] V. Ott, M. Fasshauer, A. Dalski, H.H. Klein, J. Klein, Direct effects of ciliary neurotrophic factor on brown adipocytes: evidence for a role in peripheral regulation of energy homeostasis, *J. Endocrinol.* 173 (2002) R1–R8.
- [103] M.J. Watt, N. Dzamko, W.G. Thomas, S. Rose-John, M. Ernst, D. Carling, et al., CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK, *Nat. Med.* 12 (2006) 541–548.
- [104] A. Preti, Axokine (Regeneron), *IDrugs* 6 (2003) 696–701.
- [105] M.P. Ettinger, T.W. Littlejohn, S.L. Schwartz, S.R. Weiss, H.H. McIlwain, S.B. Heymsfield, et al., Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study, *JAMA* 289 (2003) 1826–1832.
- [106] S.F. Evans, J.B. Parent, C.E. Lasko, X. Zhen, U.R. Knothe, T. Lemaire, et al., Periosteum, bone’s “smart” bounding membrane, exhibits direction- dependent permeability, *J. Bone Miner. Res.* 28 (2013) 608–617.
- [107] N.E. McGregor, I.J. Poulton, E.C. Walker, S. Pompolo, J.M. Quinn, T.J. Martin, et al., Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex- specific role in bone growth and remodeling, *Calcif. Tissue Int.* 86 (2010) 261–270.
- [108] E.M. Wagener, M. Aurich, S. Aparicio-Siegmund, D.M. Floss, C. Garbers, K. Breusing, et al., The amino acid exchange R28E in ciliary neurotrophic factor (CNTF) abrogates interleukin-6 receptor-dependent but retains CNTF receptor-dependent signaling via glycoprotein 130 (gp130)/ leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 18442–18450.
- [109] A.N. Economides, J.V. Ravetch, G.D. Yancopoulos, N. Stahl, Designer cytokines: targeting actions to cells of choice, *Science* 270 (1995) 1351–1353.

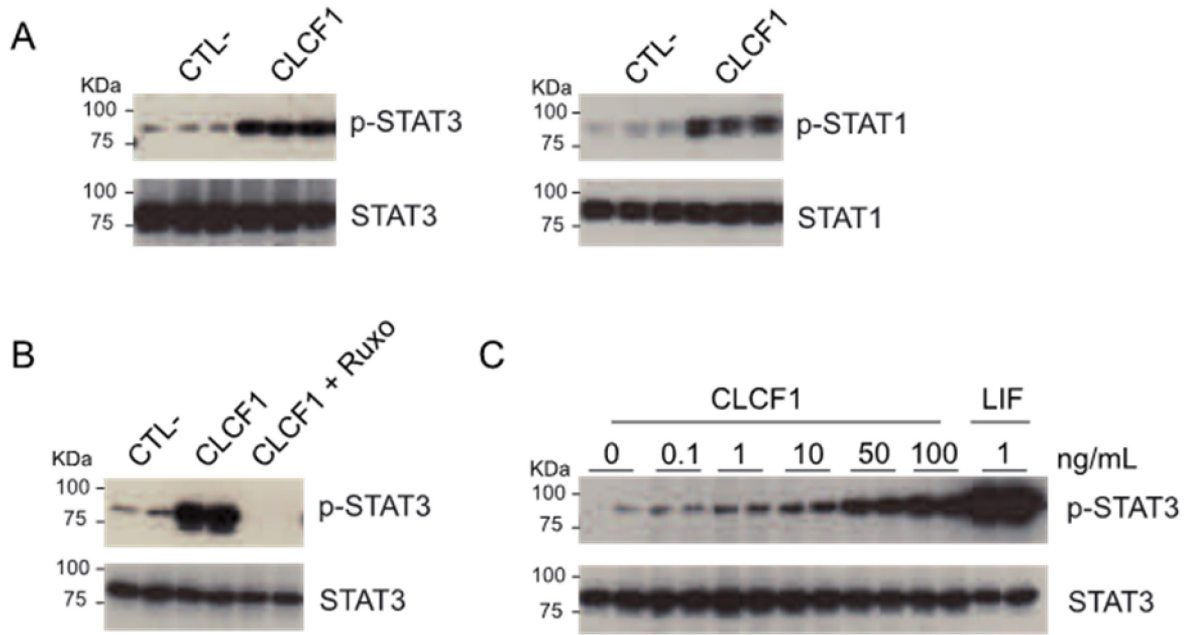
## **Annexe III.**

### **Figures Supplémentaires**

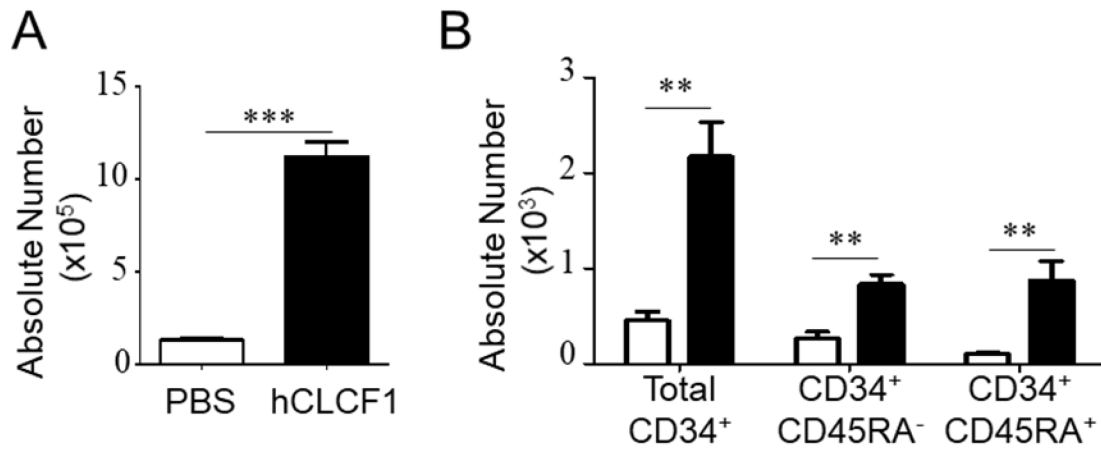




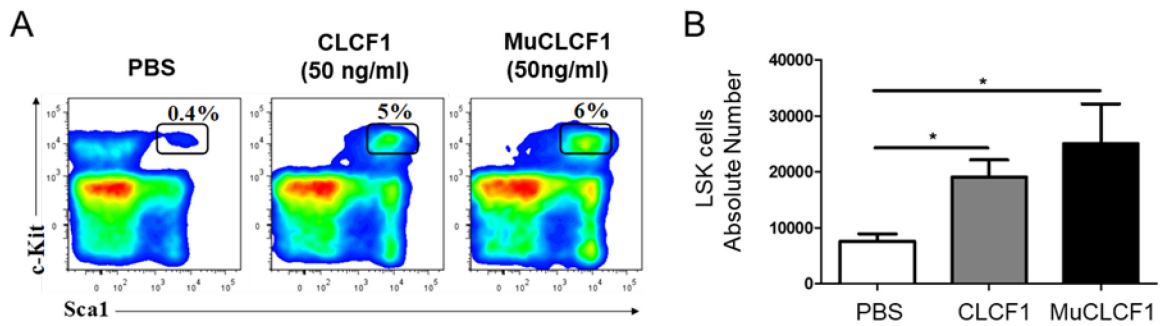
**Figure S1. CLCF1 induit la prolifération des cellules LSK en absence de cellules immunes matures.** Les cellules de moelle osseuse de souris ont été récupérées des fémurs et des tibias de souris femelles C57B/6. Les cellules immunes matures ont été soustraites séparation immunomagnétique à l'aide d'un kit *EasySep™ Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Isolation Kit* (sélection négative pour les marqueurs: CD5, CD11b, CD19, CD45R/B220, Ly6G/C(Gr-1), TER119, 7-4, EasySep™ Mouse). **(A)** Profils de cytométrie en flux des cellules LSK provenant des cultures déplétées de cellules matures après 24 h de stimulation avec du PBS ou 100 ng/ml de CLCF1. **(B)** Nombre absolu des cellules LSK en fonctions des différentes conditions de stimulations, le graphique représente les moyennes de triplicatas  $\pm$  S.D.



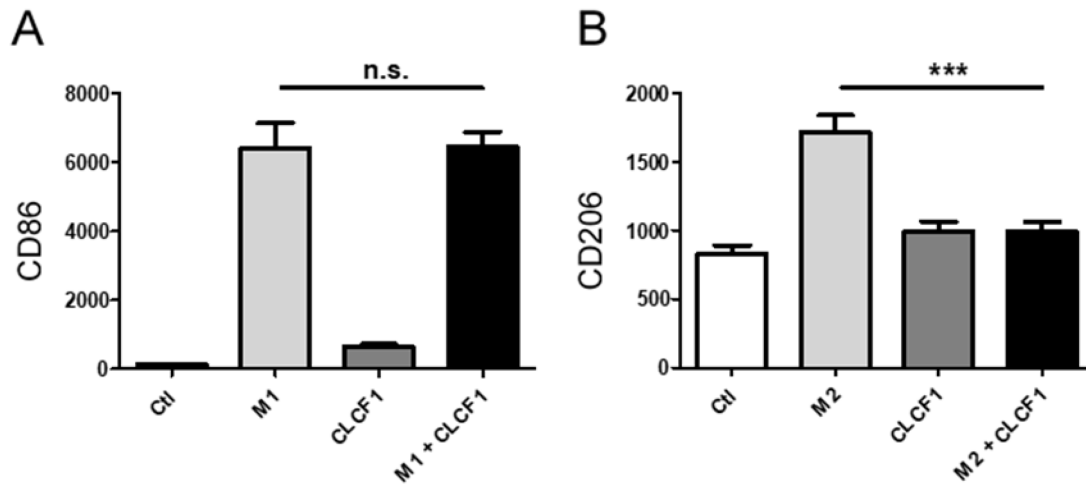
**Figure S2. CLCF1 induit la phosphorylation de STAT1 et STAT3 dans des cultures de MSC primaire.** (A-B) Les MSC ont été stimulées avec CLCF1 (100 ng/ml) ou CLCF1 (100 ng/ml) ± Ruxolitinib (10 μM) pour 15 min. Les lysats cellulaires ont été analysés par immunobuvardage de type Western Blot à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre pSTAT3, STAT3, pSTAT1 et STAT1. (C) Les MSC ont été stimulées avec 0, 0,1, 1, 10, 50 ou 100 ng/ml de CLCF1 ou 1 ng/ml de LIF pour 15 min. Les lysats cellulaires ont été analysés avec des anticorps anti-pSTAT3 et anti-STAT3 tel que décrit ci-haut.



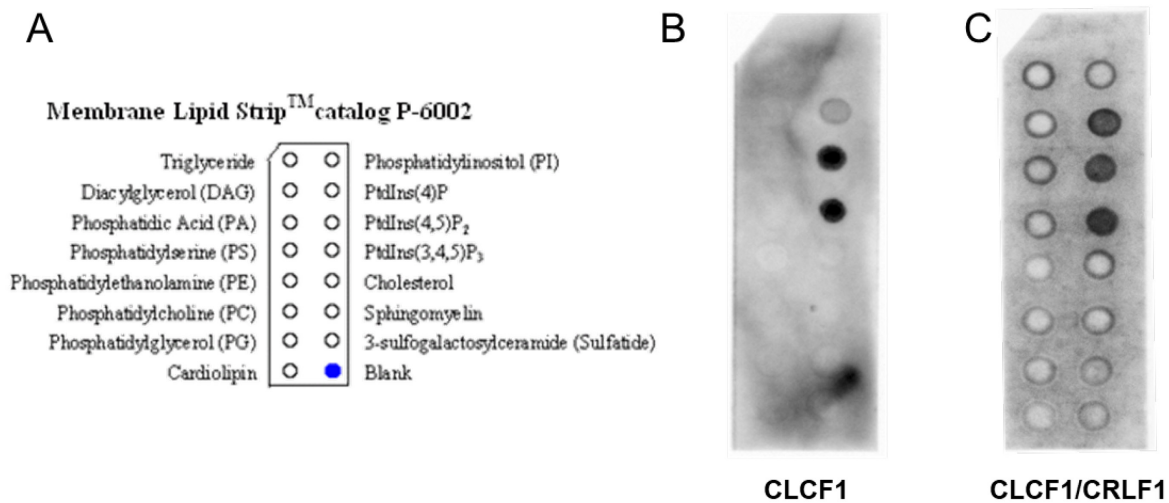
**Figure S3. CLCF1 induit l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques multipotents de Macaque.** Des cellules de moelle osseuse de macaque rhesus ont été prélevées par ponction lombaire puis mises en cultures à une densité de  $5 \times 10^5$  cellules/ml. Les cellules ont été maintenues en culture 7 jours en présence ou en absence de 50 ng/ml de CLCF1 humain. Le milieu de culture a été dilué  $\frac{1}{2}$  avec du milieu de stimulation frais tous les 2 jours. **(A)** Graphique des nombres absolus de cellules nucléées totales de la moelle osseuse. **(B)** Graphiques des nombres absolus des CSH totales (CD34<sup>+</sup>), des CSH immatures (CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>) et des CSH matures (CD34<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Les barres noires représentent les cellules stimulées avec CLCF1. Les graphiques représentent la moyenne  $\pm$  S.D.



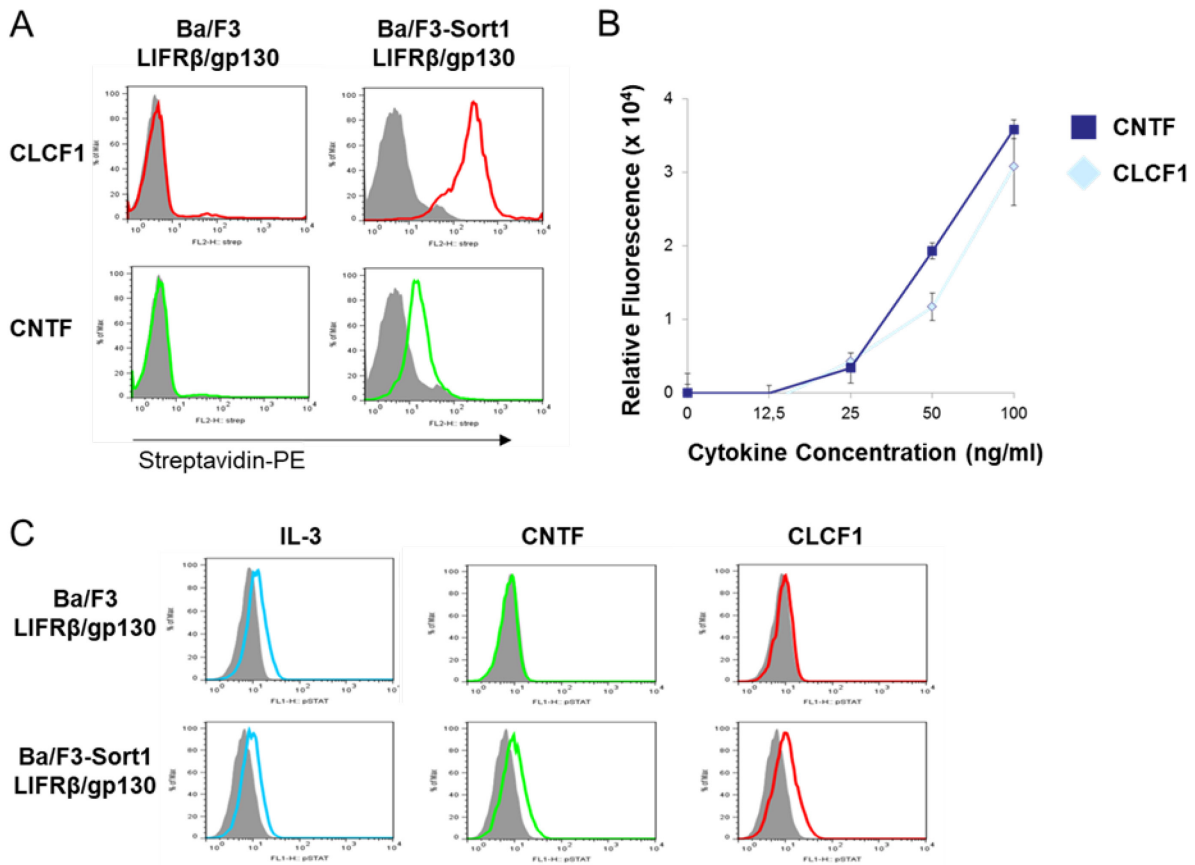
**Figure S4. CLCF1 muté pour le site I de liaison au CNTFR maintient la capacité d’expandre les cellules LSK.** Les cellules de moelle osseuse de souris ont été isolées de fémurs et de tibias de souris femelles C57BL/6. Les cellules de moelle osseuse ont été stimulées pendant 24 h avec du PBS, 50 ng/ml de CLCF1 ou 50 ng/ml de CLCF1 muté (W94A, MuCLCF1). **(A)** Profils de cytométrie en flux représentatifs des cellules LSK après 24 h de culture en fonction des différentes stimulations. **(B)** Nombres absolus des cellules LSK en fonctions des différentes stimulations (moyennes de triplicatas ± S.D).



**Figure S5. CLCF1 module la polarisation M2 induite par l'IL-4 et l'IL-13.** Les BMDM ( $1 \times 10^6$ ) ont été incubées pendant 24 h: Ctl; macrophage-CSF (10 ng/ml), M1; IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) plus LPS (100 ng/ml), M1+CLCF1; IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) plus LPS (100 ng/ml) plus CLCF1 (100 ng/ml), M2; IL-4 (50 ng/ml) plus IL-13 (30 ng/ml), M2 +CLCF1; IL-4 (50 ng/ml) plus IL-13 (30 ng/ml) plus CLCF1 (100 ng/ml) ou CLCF1 (100 ng/ml). **(A)** Analyse de l'expression de surface du marqueur CD86 par cytométrie en flux à l'aide d'un anti-CD86-PE. **(B)** Analyse de l'expression de surface du marqueur CD206 par cytométrie en flux à l'aide d'un anti-CD206-PE. Les graphiques représentent la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) de triplicatas  $\pm$  S.D.



**Figure S6. CLCF1 et CLCF1/CRLF1 interagissent avec la famille des phosphatidylinositol phosphate (PIP).** L'interaction a été testée avec des membranes hydrophobes contenant des disques de 100 pmol de différents lipides membranaires (Échelon Bioscience, no de catalogue P-6002). **(A)** Représentation schématique de la distribution des lipides sur les membranes hydrophobes. **(B-C)** Les membranes ont d'abord été bloquées à l'aide d'une solution de PBS contenant 0,1 % Tween-20 et 3 % BSA, puis incubées avec une solution PBS-BSA contenant 1 µg/ml de CLCF1 recombinant biotinylé ou 1 µg/ml de CLCF1/CRLF1. La liaison du CLCF1 aux membranes a été détectée à l'aide de streptavidine-HRP **(B)** alors que la présence du complexe CLCF1/CRLF1 a été détectée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette 6-His de CLCF1 **(C)**.



**Figure S7. CLCF1 induit l'activation d'un récepteur composé des chaînes Sortiline, LIFRβ et gp130.** Des cellules Ba/F3 exprimant LIFRβ/gp130 ou Sortiline/LIFRβ/gp130 ont été incubées 1 h à 4 °C avec 1 µg/ml de CLCF1-biotinylé ou 1 µg/ml de CNTF-biotinylé dans une solution de PBS contenant 0,1 % BSA et 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. Les cellules ont été lavées puis resuspendues dans une solution de streptavidine-PE. Les tests de liaison ont été analysés par cytométrie en flux. (B) Des cellules Ba/F3-Sortiline/LIFRβ/gp130 ont été stimulées avec des concentrations croissantes de CLCF1 ou de CNTF pendant 72 h à 37 °C. La prolifération cellulaire a été quantifiée par test d'AlamarBlue (lecture de la fluorescence à 570 nm). (C) Les cellules ont été stimulées avec 100 ng/ml de CLCF1, de CNTF ou d'IL-3 pendant 15 min à 37 °C. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis marquées avec des anti-pSTAT3-Alexa-488. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux.