

UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE
ECOLE DOCTORALE DE PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

THESE DE DOCTORAT

Spécialité de Physiologie et Physiopathologie

Présentée par **John PIRAULT**

Implication des phagocytes mononucléés dans les pathologies immuno-inflammatoires chroniques : exploration d'un modèle murin d'athérosclérose et le xanthogranulome chez l'homme.

Thèse dirigée par **Philippe GIRAL et Philippe LESNIK**

Soutenue le 02 Février 2012

Jury :

Dr Giuseppina CALIGIURI	rapporteur
Dr Giulia CHINETTI	rapporteur
Dr Carole ELBIM	examineur
Dr Muriel LAFFARGUE	examineur
Dr Pierre AUCOUTURIER	président
Dr Philippe GIRAL	directeur
Dr Philippe LESNIK	directeur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Giuseppina Caligiuri, Giulia Chinetti, Muriel Laffargue, Carole Elbim et Pierre Aucouturier qui représentent l'ensemble des membres du jury qui a accepté de réviser ce travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à l'ensemble de l'unité INSERM UMR_S 939.

A John Chapman pour m'avoir accueilli en octobre 2008 dans l'unité qu'il dirigeait.

A Philippe Giral pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour m'avoir apporté ses connaissances cliniques et sa vision de la collaboration entre cliniciens et chercheurs.

A Philippe Lesnik, co directeur de ma thèse, qui m'a suivi quotidiennement au cours de ce parcours doctoral. Merci pour l'ensemble de ton soutien dans l'orientation et le choix des projets qui ont fait partie de cette thèse. Merci pour l'apport de tes connaissances scientifiques pratiques et administratives qui ont bordé ces années. Merci à l'ensemble des acteurs qui ont participé à ces travaux parmi lesquels Laura Bouchareychas, Wilfried Le Goff, Maryse Guerin, Flora Saint Charles, Raphaël Szalat.

Enfin, merci à ma famille, mes parents Brigitte et Alain et mon frère Joffrey pour leur soutien quotidien dans l'établissement de ma vie personnelle et professionnelle.

Contenu

Remerciements	2
Contenu	3
Abbréviations	4
Avant-propos	6
I. L'athérosclérose.	8
A. Généralités	8
1. Classification et complications.....	8
2. Facteurs de risques.	11
B. Aspects cellulaires et moléculaires de l'athérosclérose.	11
1. A l'origine la dysfonction endothéliale.	11
2. L'impact des dyslipidémies : rôle pro-athérogène des LDL et de l'hypercholestérolémie.	12
3. Inflammation et apoptose.	14
II. Le système immunitaire : acteur pro et anti-athérogène.	26
A. L'immunité adaptative, lignée lymphoïde.	27
1. Les lymphocytes associés à l'augmentation de l'athérosclérose.....	29
2. Les lymphocytes associés à la protection de l'athérosclérose.....	36
B. L'immunité innée, lignée myéloïde.	44
1. Les monocytes : précurseurs myéloïdes et senseurs circulants.....	45
2. Les cellules dendritiques, interface entre l'immunité innée et adaptative.	48
3. Les macrophages, phagocytes majeurs impliqués dans l'athérosclérose.....	54
III. Objectifs	63
IV. Exposé des travaux de thèse	66
1. Article 1: Increasing survival of macrophages exerts protective functions on progression of established atherosclerotic lesions, through decreasing plasma cholesterol levels, and dampening inflammation.	66
2. Article 2: Impaired macrophage lipid homeostasis and imbalance in dendritic cell subsets are key features in normolipemic xanthoma associated with monoclonal immunoglobulin.	93
Discussion générale	126
1. Discussion sur la survie des macrophages dans l'athérosclérose murine.	126
2. Discussion sur l'étude d'une pathologie humaine : le xanthogranulome.....	137
Références	145
Annexes	161

Abbreviations

ABCA1/G1	ABC transporter A1/G1
AIM	apoptosis inhibitor of macrophage
Apoe	apolipoprotein E
BCR	B cell receptor
BDCA-2	blood dendritic cell antigen 2
CCR2	chemokine (CC motif) receptor 2
CD	cellule dendritique
CX3CR1	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
DAMP	damage associated molecular pattern
DD	death domain
DISC	death inducing signalling complex
DT	diphtheria toxin
FasL	Fas ligand
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HDL	high density lipoprotein
Hsp	heat shock protein
ICAM1	intercellular cell adhesion molecule 1
IFN	interferon
IgG/M...	immunoglobulin G/M...
IL-6/10...	interleukine 6/10...
LDL	low density lipoprotein
LDLox	LDL oxydée

LXR	liver X receptor
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MDA-LDL	malondialdehyde-LDL
MerTK	Mer tyrosine kinase
mPDCA-1	mouse plasmacytoid dendritic cell antigen 1
NFκB	nuclear factor kappa b
NLR	NOD-like receptor
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PC	phosphorylcholine
pDC	plasmacytoid dendritic cell
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PRR	pattern recognition receptor
PTX	pentoxifylin
RORγt	retinoid related orphan receptor γ t
SCID	severe combined immunodeficiency
SOCS	suppressor of cytokine signalling
STAT	signal transducer and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TGFβ	transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1

Avant-propos

L'inflammation fait partie des processus clés mis en jeu lors de perturbations de l'intégrité de l'organisme. Elle peut être mise en place en réponse aux infections ou bien lors de dommages cellulaires. On parle alors d'inflammation aiguë ayant pour finalité un retour rapide à la normalité. Dans certains cas, une inflammation non résolutive persiste dans l'organisme et devient délétère, on parle alors d'inflammation chronique. Avec les populations vieillissantes, les pays industrialisés ont vu croître de façon importante la part de cette inflammation chronique. En effet, un rapport de l'OMS classe les maladies immuno-inflammatoires comme première cause de mortalité dans le monde. Parmi ces maladies immuno-inflammatoires, 63% de décès sont imputés aux cardiopathies et maladies vasculaires telles que l'athérosclérose.

Ainsi comprendre les mécanismes impliqués au cours de ces pathologies est un enjeu majeur en santé publique afin d'améliorer les traitements actuels majoritairement ciblés sur le cholestérol, mais permettre aussi de trouver de nouvelles molécules visant spécifiquement l'inflammation.

L'athérosclérose fait partie de ces maladies immuno-inflammatoires. Ce phénomène responsable de la majorité des complications vasculaires à tout d'abord été décrit comme une pathologie du métabolisme lipidique où une hypercholestérolémie associée à de fort taux de lipoprotéines de faible densité (LDL) représente le facteur de risque majeur de formation des plaques. Les traitements hypocholestérolémiants actuels qui permettent de diminuer le taux de cholestérol associé aux LDL (LDL-C), associés à des traitements permettant une augmentation du cholestérol associé aux lipoprotéines de forte densité (HDL-C) considérées comme anti-athérogènes, ont permis de réduire les complications associées à cette pathologie sans toutefois les supprimer totalement puisqu'il est rapporté un risque résiduel. Or depuis les années 1990-2000, grâce à de nombreuses études sur des modèles animaux, il a été mis en

avant l'implication de la réponse immuno-inflammatoire dans cette maladie en plus du risque lié à l'hypercholestérolémie. En effet, de nombreux événements tels que l'apoptose cellulaire induite par les dyslipidémies au sein de la paroi vasculaire, entraînent le recrutement de leucocytes et l'établissement d'une inflammation chronique qui participe à la formation de la plaque d'athérome. Parmi ces leucocytes recrutés, il est établi un rôle de l'immunité adaptative avec un effet pro-athérogène des lymphocytes T inflammatoires. L'étude de l'immunité innée apparaît plus complexe. Il est maintenant décrit un possible rôle protecteur des macrophages initialement considérés comme pro-athérogènes, faisant émerger de nouvelles possibilités thérapeutiques sur la régression des plaques d'athérome. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans cette dynamique d'étude du rôle des phagocytes mononucléés dans les maladies immuno-inflammatoires chroniques avec pour support un modèle murin d'athérosclérose ainsi que l'exploration d'une pathologie humaine, le xanthogranulome. Ce manuscrit détaillera sous forme d'une introduction bibliographique l'athérosclérose en commençant brièvement par la physiopathologie de la maladie pour ensuite s'attarder sur les avancées majeures des dernières années. J'aborderai donc ensuite le rôle de l'apoptose cellulaire dans le développement des lésions. Je terminerai cette première partie sur l'implication du système immunitaire dans ce processus à l'origine de la majorité des atteintes cardiovasculaires. J'exposerai, ensuite les résultats de mes travaux sur l'évolution de l'athérosclérose dans des modèles murins transgéniques où l'apoptose du macrophage est réduite chez des souris hypercholestérolémiques LDLr^{KO} ou Apoe^{KO}. Dans un second temps, je présenterai les données obtenues chez des patients présentant des xanthomes plans ou granulomateux avec dépôts de lipides sous-cutanés sans hypercholestérolémie associée. L'ensemble de ces résultats nous amènera à considérer différemment le rôle des phagocytes mononucléés dans ces pathologies en fonction de la prédominance de certaines sous

populations à caractère plus ou moins inflammatoire, ainsi que la modulation possible de celles-ci au cours de thérapies.

I. L'athérosclérose.

A. Généralités

1. Classification et complications.

L'athérosclérose, initialement classée comme maladie métabolique avec comme facteur de risque majeur l'hypercholestérolémie ¹, est aujourd'hui considérée comme une affection immuno-inflammatoire chronique avec une dérégulation du système immunitaire. Néanmoins, la classification anatomo-pathologique des différents stades des lésions par Stary est toujours d'actualité (Figure 1).

Nomenclature and main histology	Sequences in progression	Main growth mechanism	Earliest onset	Clinical correlation
Type I (initial) lesion isolated macrophage foam cells	<pre>graph TD; I((I)) --> II((II)); II --> III((III)); III --> IV((IV)); IV --> V((V)); IV --> VI((VI)); V --> VI;</pre>	growth mainly by lipid accumulation	from first decade	clinically silent
Type II (fatty streak) lesion mainly intracellular lipid accumulation			from third decade	
Type III (intermediate) lesion Type II changes & small extracellular lipid pools				
Type IV (atheroma) lesion Type II changes & core of extracellular lipid		accelerated smooth muscle and collagen increase	from fourth decade	clinically silent or overt
Type V (fibroatheroma) lesion lipid core & fibrotic layer, or multiple lipid cores & fibrotic layers, or mainly calcific, or mainly fibrotic				
Type VI (complicated) lesion surface defect, hematoma-hemorrhage, thrombus		thrombosis, hematoma		

Figure 1 : Classification des différents stades des lésions d'athérosclérose. ²

On retrouve chez les jeunes adultes le 1^{er} stade de la maladie avec la présence de stries lipidiques qui sont asymptomatiques et peuvent soit évoluer en lésions plus graves soit disparaître. Ces lésions se développent au niveau des artères de gros et moyen calibres, dans les zones de bifurcation où les forces de cisaillement sont les plus faibles. Ces stries lipidiques sont composées majoritairement d'infiltrats cellulaires gorgés de lipides au sein du sous endothélium. Les macrophages, phagocytes mononucléés dérivés des monocytes circulants, ainsi que les lymphocytes T représentent les populations majoritaires présentes à ce stade.

L'évolution des plaques d'athérome est caractérisée par l'apparition d'un noyau de lipides extracellulaires associés à des débris cellulaires et des cellules spumeuses. L'ensemble est

recouvert d'une chape fibreuse de cellules musculaires lisses et de collagène. Là encore, les cellules du système immunitaire sont abondantes et présentes notamment en périphérie. On parle à ce stade de plaque fibro-lipidique, présentant une saillie plus ou moins importante dans la lumière vasculaire.

Enfin le dernier stade correspond à la plaque d'athérosclérose complexe. Elle est généralement à l'origine des complications potentiellement mortelles de la pathologie (infarctus du myocarde et/ou accident vasculaire cérébral). Son apparition ne dépend pas du volume de la plaque mais plutôt de sa structure en comparaison avec la plaque fibro-lipidique. En effet, via l'inflammation, la chape fibreuse peut se rompre là où réside un grand nombre de macrophages et de cellules immunitaires, libérant ainsi des facteurs pro-inflammatoires. Cette rupture expose le matériel pro-thrombotique du cœur nécrotique au sang, entraînant la formation d'un thrombus qui peut directement sténoser l'artère, ou se détacher et oblitérer la circulation en aval de l'origine de la plaque (Figure 2).

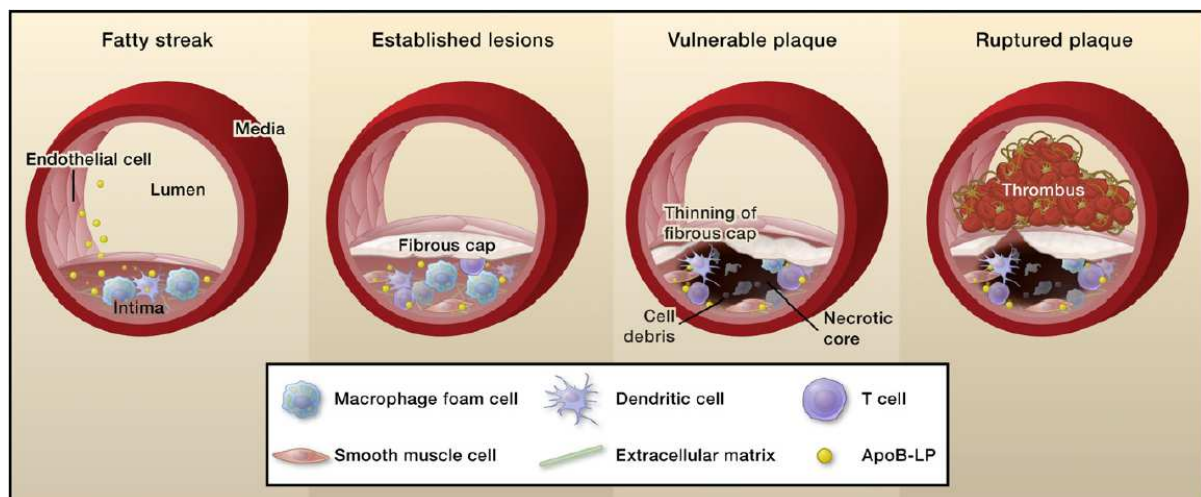


Figure 2 : Progression d'une lésion d'athérosclérose.³

2. Facteurs de risques.

Les études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence de nombreux facteurs de risques prédisposant aux maladies cardiovasculaires et donc à l'athérosclérose. Certains de ces facteurs sont non modifiables tels que le sexe, l'âge et la génétique. D'autres au contraire peuvent être modulés par des traitements pharmacologiques ou bien par des changements de comportements. Parmi ceux-ci on peut citer les dyslipidémies, le diabète et l'obésité d'origines non génétiques, ainsi que l'hypertension artérielle ou bien le tabagisme ⁴.

En ce qui concerne le sexe, il est montré que durant la période d'activité génitale, les hommes sont plus prédisposés aux accidents cardiovasculaires que les femmes. Néanmoins, quelques années après la ménopause, cette différence tend à se réduire. De plus, la mortalité associée à ces accidents vasculaires est plus importante chez la femme. L'idée d'une implication des œstrogènes a été avancée mais reste débattue.

L'âge est l'un des premiers facteurs de risque. En effet, l'athérosclérose est une maladie qui semble débiter très tôt au cours de la vie pour se développer lentement et avoir des complications plutôt tardives.

La génétique enfin fait partie de ces facteurs non modifiables, elle intervient surtout dans les cas précoces de la pathologie.

B. Aspects cellulaires et moléculaires de l'athérosclérose.

1. A l'origine la dysfonction endothéliale.

L'endothélium constitue une barrière sélective entre le sang et les tissus. Les cellules endothéliales qui le composent contrôlent la perméabilité vasculaire à nombre de complexes moléculaires dont les lipoprotéines plasmatiques. Comme nous l'avons mentionné, le développement des lésions se fait majoritairement aux zones de bifurcation, sites où les forces

de cisaillement sont les plus faibles. Ces changements hémodynamiques entraînent une activation des cellules endothéliales qui perdent notamment leur fonction de perméabilité sélective ⁵. S'ajoute une expression accrue des molécules d'adhérences sur ces cellules favorisant le recrutement des cellules inflammatoires et l'induction d'un stress oxydatif qui va notamment être impliqué dans l'oxydation des lipides.

2. L'impact des dyslipidémies : rôle pro-athérogène des LDL et de l'hypercholestérolémie.

Suite à l'accumulation sous endothéliale des lipoprotéines, celles-ci interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire tels que les protéoglycans et s'oxydent. Plusieurs éléments montrent que cette oxydation a lieu *in vivo*. En effet, les LDL des lésions présentent des modifications identiques à celles des LDL oxydées (LDLox) *in vitro*. De plus, la présence d'anticorps dirigés contre ces LDLox a été retrouvée aussi bien dans les lésions que dans le plasma. Enfin, l'expérimentation sur des modèles animaux montre que l'utilisation d'antioxydants ralentit l'athérosclérose ^{6 7}. L'hypothèse de la formation de ces particules oxydées fait intervenir la production de ROS au cours de l'inflammation (Figure 3) ⁸.

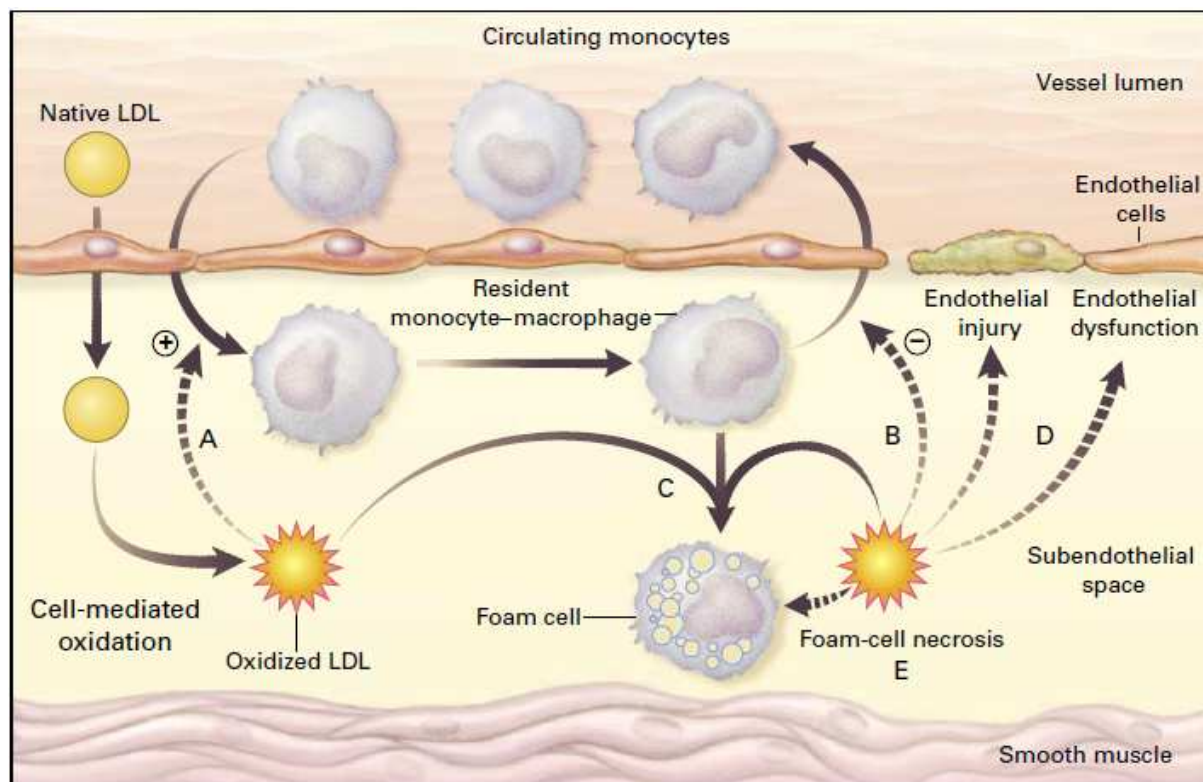


Figure 3 : le rôle oxydatif des LDL dans l'athérosclérose. Les LDL natives traversent l'endothélium vasculaire et subissent des modifications oxydatives via la matrice extracellulaire et les cellules environnantes. Les effets sont -(A)- une stimulation du chimiotactisme des monocytes -(B)- une inhibition de l'égression des monocytes déjà présents dans l'espace sous-endothélial -(C)- une implication dans la formation des cellules spumeuses -(D)- des dommages dans l'endothélium et -(E)-l'induction de la mort des cellules spumeuses.

L'ensemble des modifications subies par les LDL au sein de l'intima fait que celles-ci seront reconnues par d'autres récepteurs que le récepteur LDLr. Ces récepteurs éboueurs ou « scavenger » (SRA, CD36...) sont notamment présents sur les cellules du système immunitaire où ils jouent le rôle de « pattern recognition receptor » (PRR). Lors d'une réaction immunitaire, ils vont reconnaître des motifs communs aux pathogènes : les « pathogen associated molecular patterns » (PAMP) et induire des signaux de danger qui vont permettre au système immunitaire de s'activer complètement. Dans le cadre de l'athérosclérose, il est démontré que ces mêmes récepteurs sont capables de reconnaître des molécules du soi modifiées telles que les LDLox (Figure 4)^{10 11 12}.

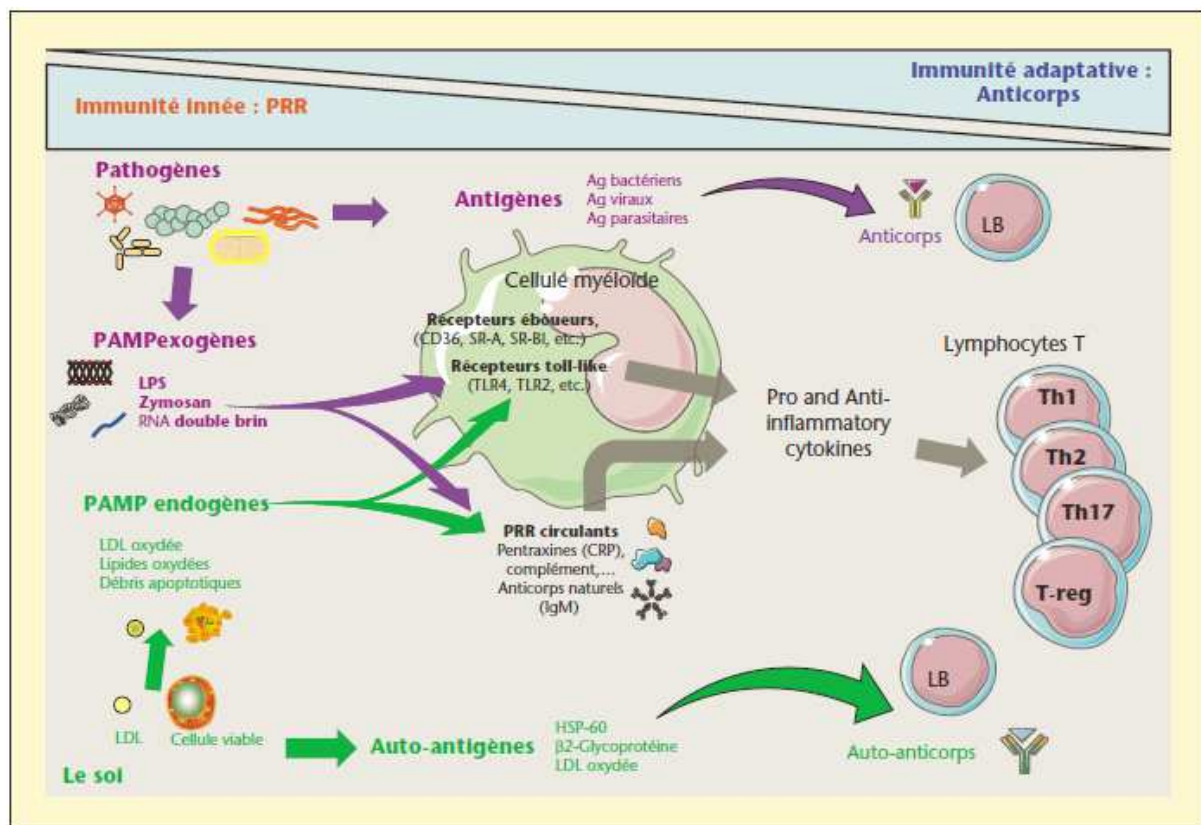


Figure 4 : vue d'ensemble des interactions entre les pathogènes exogènes, les signaux de dangers endogènes et les récepteurs PRR cellulaires ou circulants portés par les cellules myéloïdes (macrophages et CD) (annexe 1).

Cette reconnaissance des lipoprotéines par les cellules du système immunitaire entraîne la formation de cellules spumeuses plus sensibles à l'apoptose et la nécrose. Ceci favorise la formation du cœur nécrotique des lésions avancées^{13 14}.

3. Inflammation et apoptose.

a. Apoptose vs nécrose.

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée que l'on peut considérer comme un « suicide actif » des cellules. Ce mécanisme est important de façon naturelle pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et le développement des organismes¹⁵. Cependant, il

s'agit aussi d'un processus qui est retrouvé dans diverses pathologies chez l'homme. Ce processus diffère de la nécrose (autre mort cellulaire) puisqu'il permet de conserver l'intégrité membranaire (Figure 5). En effet, lors de la nécrose, il se produit rapidement une altération de la membrane, un gonflement mitochondrial et un relargage du contenu cellulaire dans le milieu externe. A l'inverse, l'apoptose est caractérisée par une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement membranaire formant les corps apoptotiques contenant le milieu intracellulaire ¹⁶. Ces corps pourront ensuite être phagocytés par les macrophages ou cellules phagocytaires environnantes évitant ainsi l'inflammation tissulaire. Néanmoins, lorsque ces corps apoptotiques ne sont pas éliminés rapidement par les phagocytes, l'apoptose peut alors se transformer en nécrose post apoptotique, phénomène probablement mis en jeu dans les lésions avancées d'athérosclérose.

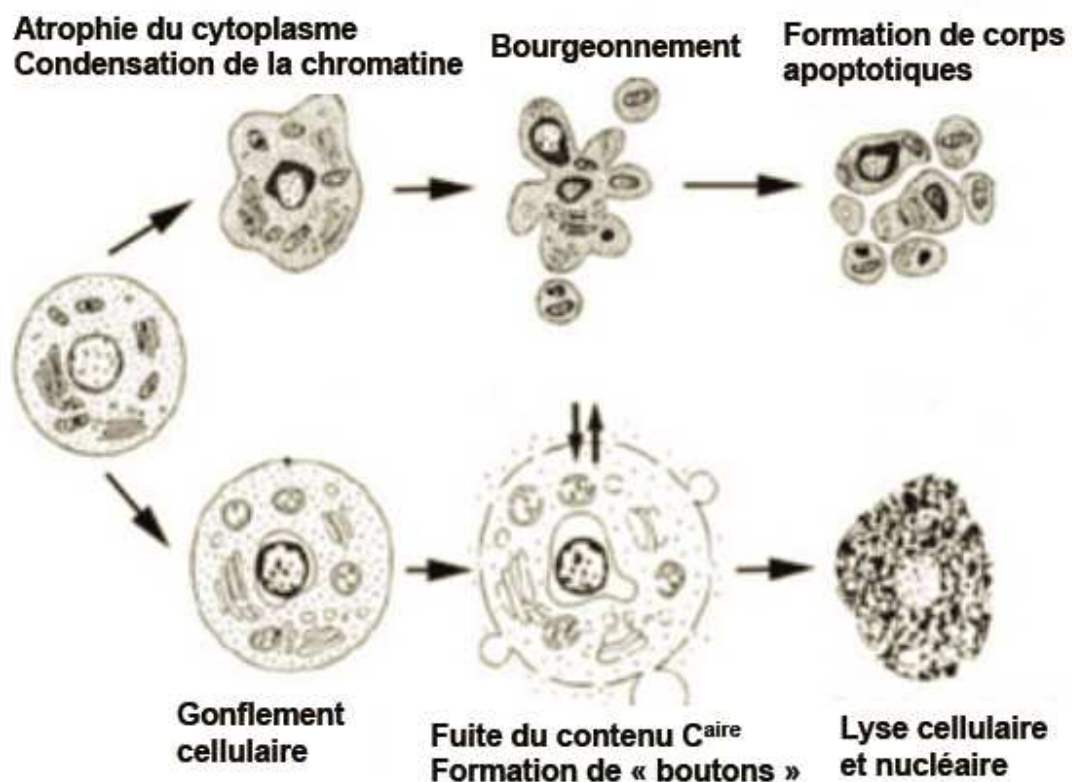


Figure 5 : différences entre apoptose (en haut) et nécrose (en bas) ¹⁶

L'apoptose peut être induite par divers stimuli et peut faire intervenir plusieurs voies différentes. Il est décrit une voie extrinsèque qui met en jeu des récepteurs membranaires et une voie intrinsèque impliquant la mitochondrie (Figure 6). L'élément commun aux 2 voies d'apoptose est l'activation finale de protéases nommées caspases pour « cystin-aspartyl specific proteases ». Il en a été identifié, environ 14 à ce jour, de spécificités différentes qui vont cliver les protéines en partie C terminale de résidus aspartate ¹⁷. Ces enzymes sont présentes constitutivement dans les cellules mais sous une forme inactive que l'on appelle pro-caspase. Un clivage protéolytique va entraîner l'activation de celles-ci. On distingue différents type de caspases selon la taille de leurs pro-domaines. Les caspases à pro-domaine long (2, 8, 9, 10) sont des caspases initiatrices qui, lorsqu'elles sont activées, ne vont pas entraîner directement l'apoptose mais activer d'autres caspases effectrices. Ces enzymes effectrices sont les caspases 3, 6, 7 qui présentent des pro-domaines courts ¹⁸.

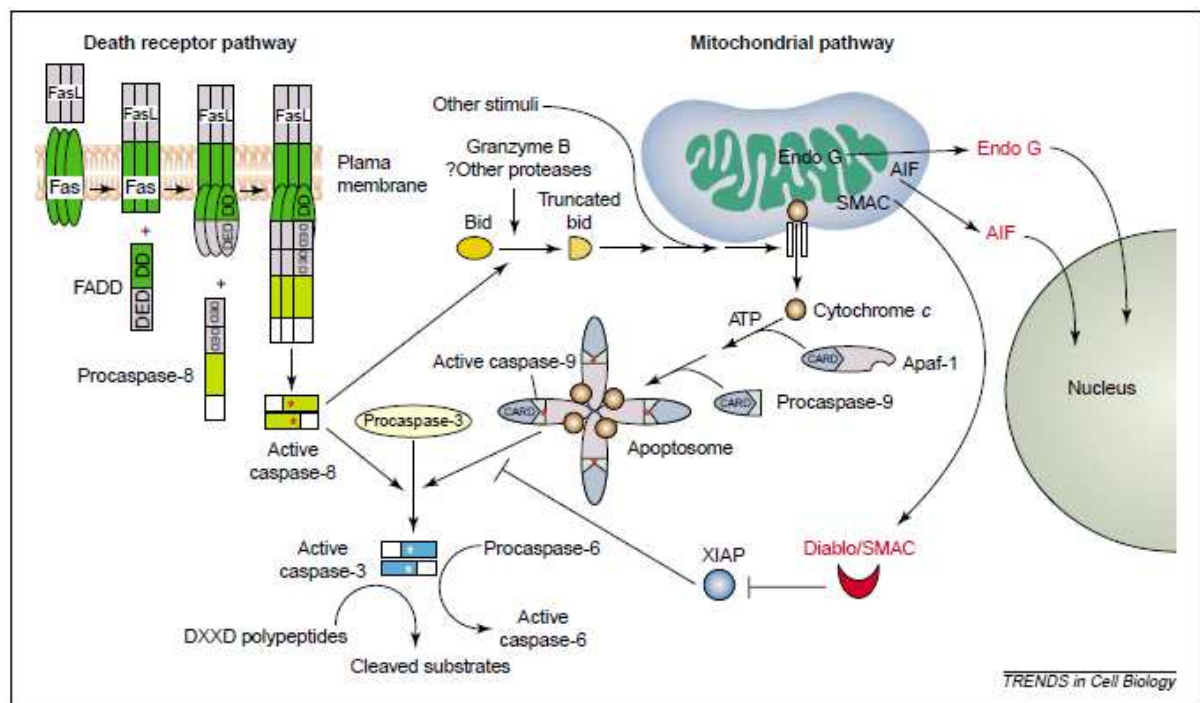


Figure 6 : Les 2 voies d'apoptose, à gauche la voie des récepteurs de mort avec l'exemple du couple Fas/FasL, à droite la voie intrinsèque mitochondrie dépendante ¹⁹

b. Voie des récepteurs de mort et voie mitochondriale.

Pour la voie extrinsèque, les récepteurs mis en jeu appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF^{20 19}. On trouve par exemple le récepteur Fas qui lorsqu'il s'avère associé à son ligand FasL (CD95 et CD95L respectivement), va changer de conformation et se lier en partie intracytoplasmique à un complexe moléculaire DISC (Death inducing signaling complex). Ceci aboutit au clivage de la pro-caspase 8 en une forme active qui clivera alors elle-même la pro-caspase 3²¹. L'autre grand récepteur de mort est le récepteur au TNF α : le TNFRI. Contrairement au récepteur Fas, la liaison avec son ligand n'entraîne pas l'apoptose mais au contraire la survie. En effet, ce récepteur n'induit pas le recrutement du complexe DISC mais l'activation d'un 1^{er} complexe constitué du récepteur ainsi que de protéines à domaine de mort (DD). Ce complexe I va alors activer NF κ B qui présente des propriétés anti apoptotique via l'expression de gènes tels que Bcl-2, Bcl-x_L ou c-Flip. Ce complexe I est transitoire et subit après quelques minutes des modifications post traductionnelles qui entraînent une séparation des diverses protéines du récepteur. Les molécules ayant un DD peuvent alors interagir avec les mêmes protéines que celles du complexe DISC et induire une éventuelle apoptose²². La décision entre survie ou apoptose dépend ainsi du taux de c-Flip et donc du niveau d'activation de NF κ B qui possède cette molécule pour cible transcriptionnelle. L'autre voie menant à l'apoptose est la voie mitochondriale. En réponse à des stimuli de stress tels que les drogues cytotoxiques, les radiations, les stress oxydatifs ou bien les carences en facteurs trophiques, la mitochondrie va pouvoir activer un ensemble de protéines qui vont aboutir à la libération dans l'espace intermembranaire de facteurs apoptogènes comme le cytochrome c pour une voie caspase dépendante ou d'autres molécules comme AIF ou EndoG qui vont induire une apoptose caspase indépendante²³. La régulation de cette voie passe par les membres de la famille des protéines Bcl-2^{24 25 26 27}. Dans cette famille de protéines nous

retrouvons des molécules aux propriétés anti-apoptotique telles que Bcl-2 ou Bcl-x_L, et d'autres ayant des fonctions pro-apoptotique comme Bax/Bak ²⁴. L'induction de l'apoptose sera dépendante du taux relatif des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques. Des protéines sentinelles regroupées sous la famille « BH3 » sont capable de détecter de nombreuses anomalies structurelles ou fonctionnelles préjudiciables à la cellule et ainsi d'activer la voie apoptotique mitochondrie dépendante. Pour cela elles ont la capacité soit d'activer directement les protéines pro-apoptotiques, soit de séquestrer les protéines anti-apoptotiques levant l'inhibition créée sur l'apoptose ^{28 29}.

Au final, l'activation de la voie mitochondriale aboutira comme la voie des récepteurs de mort, à l'activation de la caspase 3, caspase exécutive qui agira sur ses cibles cellulaires.

Dans certains cas les 2 voies peuvent agir communément pour amener à la mort cellulaire, via l'action de tBid clivé par la caspase 8 ²³.

c. Apoptose et athérosclérose.

Dans les conditions normales, les cellules apoptotiques sont efficacement éliminées des tissus par les macrophages. Ainsi en toute circonstance l'apoptose est faible au sein de la paroi vasculaire. En condition pathologique, l'apoptose est augmentée dans les zones athérogènes et touche plusieurs types cellulaires distincts comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, les lymphocytes T et les macrophages qui représentent la population la plus touchée par ce phénomène ^{30 31 32}. De plus, le niveau de cellules apoptotiques est directement corrélé avec le stade d'avancement de la plaque d'athérome ainsi qu'à sa vulnérabilité et donc sa possibilité de rupture ³³. Plusieurs facteurs sont décrits comme responsables de l'augmentation de l'apoptose au cours de la pathologie.

In vitro, l'augmentation du taux intracellulaire de cholestérol libre dans le macrophage ³⁴ ou le traitement de macrophages par des oxystérols ³⁵ induit l'activation de Bax. De plus, une

augmentation de l'expression de Bax et d'autres pro-apoptotiques est montrée dans les plaques humaines et murines à tous les stades de la pathologie confirmant le lien entre hypercholestérolémie et apoptose dans l'athérosclérose ^{36 37 38}. Bien que la mort des macrophages spumeux par apoptose ait longtemps été considérée comme une étape clé de la formation du cœur nécrotique ^{39 40}, le caractère protecteur ou délétère de l'apoptose du macrophage sur la progression des lésions d'athérosclérose demeure flou. D'une part, l'apoptose du macrophage pourrait limiter la production de facteurs de croissance ainsi que de cytokines inflammatoires, réduisant la progression des lésions. D'autre part, la mort des macrophages pourrait avoir des effets inverses en augmentant la croissance des lésions, car elle entraînerait une baisse de la production d'Apoe mais aussi réduirait l'élimination de médiateurs d'inflammations et de toxicités tels que les LDL modifiées.

Les travaux réalisés sur des modèles de souris génétiquement modifiées, permettant de baisser ou d'augmenter le nombre de macrophages lésionnels en apoptose, ont démontré l'existence d'une corrélation inverse entre la quantité de macrophages lésionnels apoptotiques et la taille des lésions précoces. Ainsi, des souris APOE*3-Leiden irradiées et transplantées par des cellules de moelle osseuse déficientes en *p53* présentent une tendance à la baisse du nombre de macrophages apoptotiques dans leurs lésions en comparaison avec les souris transplantées par des cellules de moelle osseuse d'animaux sauvages ⁴¹. Dans ce modèle, les auteurs rapportent un doublement de la taille des lésions sans effet sur le nombre de cellules lésionnelles en prolifération. Ceci suggère que la baisse de l'apoptose du macrophage favorise le développement des plaques précoces. Toutefois, une approche similaire par transplantation de moelle osseuse de souris sauvages ou *p53^{neg/neg}* dans des souris LDLr^{KO} montre également une augmentation de la taille des plaques précoces mais suggère que ce phénotype est plutôt associé à un effet sur la prolifération des macrophages que sur leur susceptibilité à l'apoptose ⁴². Une étude récente complète ces résultats, ainsi Arai et ses collaborateurs montrent que la

délétion de la protéine de survie AIM (Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophages) chez la souris rend le macrophage fortement susceptible à l'apoptose induite par les LDLox et diminue le développement de l'athérosclérose ⁴³. Ainsi, au sein de lésions précoces, la mort du macrophage par apoptose limite la cellularité et la progression des plaques. Ces travaux sont confirmés par une approche inverse au sein de notre laboratoire en utilisant des souris exprimant la protéine anti-apoptotique hBcl-2 sous le contrôle du promoteur du gène CD68 (protéine exprimée spécifiquement par les macrophages) ⁴⁴. Dans cette étude, une augmentation de la taille des lésions précoces est rapportée chez ces souris probablement associée à une augmentation de la cellularité.

A l'inverse, au sein des lésions avancées d'athérosclérose, l'apoptose cellulaire et plus particulièrement du macrophage est pathologique. Cette étude dans notre laboratoire montre en effet que la protection des macrophages face à la mort cellulaire limite le développement des lésions tardives. Une autre étude à laquelle j'ai participé dans notre laboratoire et ayant une approche miroir de celle-ci confirme ce résultat. En effet, des souris ayant une apoptose augmentée des macrophages sont générées par croisement de souris exprimant le gène de la recombinaison Cre sous contrôle du promoteur LysM des macrophages avec des souris dont le gène anti-apoptotique Bcl_{xL} est floxé. Les souris obtenues (souris LysM Cre Bclx Flox/Flox) présentent donc une délétion du gène anti apoptotique Bcl_{xL} dans les macrophages. L'analyse de ces souris révèle que la taille des lésions précoces n'est pas modifiée alors que dans les phases plus tardives de la maladie les lésions sont augmentées en comparaison aux souris contrôles (anexe andrew). Ainsi, grâce à ces résultats, on peut dire que l'apoptose est protectrice dans les phases précoces et pro-athérogène dans les phases plus avancées de la maladie. De plus, ces deux études soulèvent l'hypothèse qu'outre l'apoptose cellulaire, une modification de la capacité de phagocyter les cellules apoptotiques peut être impliquée dans le développement de l'athérosclérose. Ce phénomène est appelé efferocytose.

d. L'efferocytose en condition normale et pathologique.

Lors de la mort cellulaire programmée, les cellules avoisinantes ont un rôle crucial de nettoyage des débris cellulaires afin de limiter les dommages tissulaires. Ce phénomène d'efferocytose implique de nombreux médiateurs aboutissant au processus de phagocytose des cellules apoptotiques.

Lors de cette mort cellulaire, les cellules libèrent un ensemble de signaux ayant pour fonction d'attirer les phagocytes sur place. Ces signaux appelés « find me » sont nombreux parmi lesquels on trouve la thrombospondine, les composants ribosomiaux, la lysophosphatidylcholine, certains nucléotides comme l'ATP ou l'UTP, des protéines de choc thermique « hsp » et bien d'autres.

Afin que les phagocytes recrutés sur le site puissent différencier les cellules viables des cellules apoptotiques, ces signaux « find me » sont accompagnés d'une réduction de l'expression de signaux protecteurs « don't eat me » au profit de signaux signalant la nécessité de phagocytose « eat me ». Dans les signaux de protection, on retrouve notamment le CD31 (ou PECAM-1) qui lorsqu'il est reconnu par le phagocyte permet un détachement de celui-ci d'avec la cellule qui le porte. Ainsi le contact établi entre la cellule viable et le phagocyte est rompu et la phagocytose est impossible. A l'inverse, en condition apoptotique, le signal de cette molécule est diminué permettant au phagocyte de jouer son rôle ⁴⁵. De même, on peut citer le CD47 qui présente la même fonction d'inhibition de la phagocytose. Au cours de l'efferocytose des corps apoptotiques, cette molécule est inhibée ⁴⁶. Les molécules « eat me » qui apportent le signal inverse sont quant à elles augmentées. On peut noter notamment la phosphatidylsérine et l'annexine I comme médiateurs impliqués ^{47 48}.

Une fois ces signaux émis et reconnus par les phagocytes recrutés, une interaction doit s'établir entre la cellule apoptotique et le phagocyte. Pour cela, des récepteurs présents sur

l'efferocyte vont reconnaître des molécules adaptatrices qui auront fixé la cellule apoptotique. Parmi ces molécules on trouve la lactadhérine (MFG-E8), Gas 6 ou encore la protéine S, mais aussi certaines molécules du complément comme le C1q. Ces molécules permettent une efferocytose suivant diverses voies en se liant soit au récepteur MerTK, aux $\alpha\beta$ intégrines ou aux récepteurs des parties constantes des immunoglobulines (RFC). Suite à ces reconnaissances ligands-récepteurs, le phagocyte va modifier son cytosquelette pour permettre l'ingestion de la cellule apoptotique puis sa dégradation intracellulaire. Au cours de l'efferocytose, une cascade de signalisation complexe aboutit à la résolution de l'inflammation. Ceci implique des médiateurs lipidiques comme les lipoxines, les resolvines et les protectines, mais aussi les récepteurs mentionnés ci-dessus qui semblent capables d'inhiber les voies de signalisation induite par l'engagement des PRR ^{49 50}. Ces processus permettent notamment à l'efferocyte de produire des molécules anti-inflammatoires telles que le TGF β et l'IL-10. De plus, cette phagocytose de cellules apoptotiques expose l'efferocyte à une forte quantité de lipides intracellulaires qui va contrebalancer la toxicité résultante par une augmentation de ces capacités d'efflux en augmentant les facteurs nucléaires PPAR « peroxisome proliferator activated receptor » qui aboutissent à une augmentation des transporteurs du cholestérol impliqués dans le début du retour inverse vers le foie ^{51 52 53}.

En condition pathologique comme dans l'athérosclérose précoce, les données mentionnées ci-dessus sur l'absence d'incidence de l'apoptose indiquent de manière indirecte que l'élimination des cellules apoptotiques par phagocytose dans les lésions jeunes est très efficace et bénéfique sur le développement de la pathologie. Dans ce sens, il est montré que des macrophages spumeux, caractéristiques des cellules observées dans les lésions précoces, sont capables de reconnaître et de phagocyter des cellules apoptotiques ⁵⁴. De plus, en dépit d'une augmentation de l'apoptose, cette efferocytose reste extrêmement efficace ⁵⁵.

En revanche, l'environnement des plaques avancées contient un surplus de tous ces médiateurs ainsi que ceux de l'inflammation aboutissant au recrutement progressif et continu des phagocytes ^{56 57}. De plus, on observe une nette augmentation du nombre de macrophages apoptotiques dans les lésions avancées par rapport aux lésions précoces, ce qui va dans le sens d'une plus forte induction de l'apoptose mais surtout d'un défaut de phagocytose des cellules apoptotiques dans des lésions avancées (Figure 7) ⁵⁸.

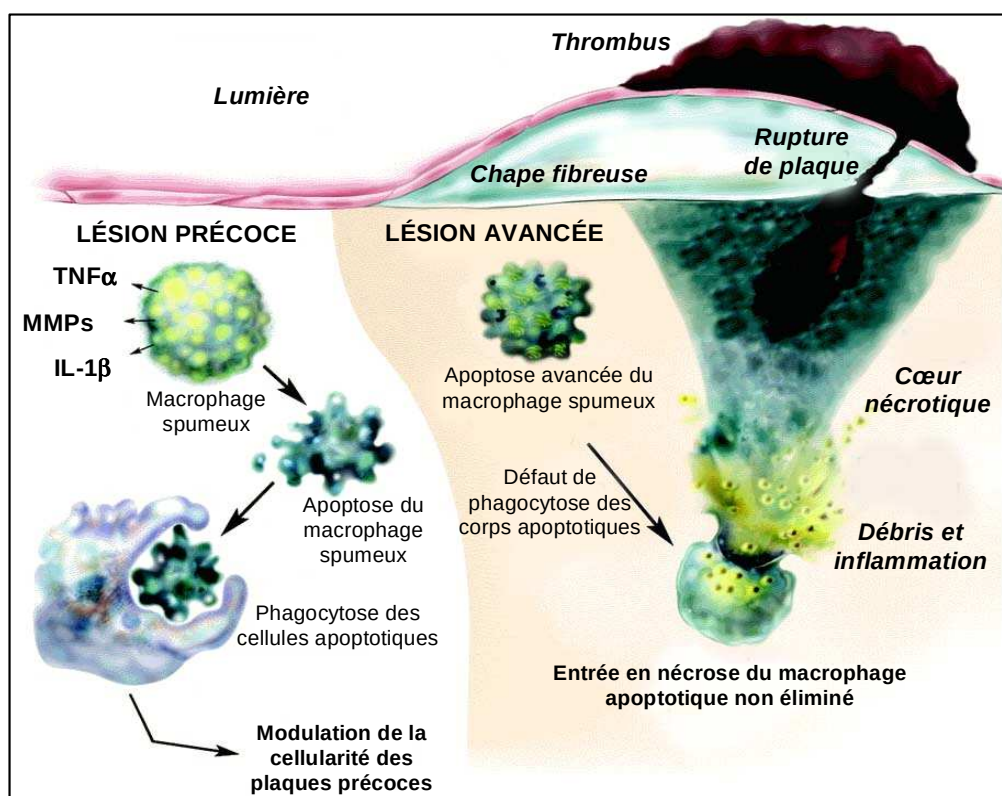


Figure 7 : Schéma hypothétique illustrant l'impact de l'apoptose du macrophage en fonction du stade des lésions d'athérosclérose et de l'efficacité de l'élimination des cellules apoptotiques ⁵⁸.

Une étude récente soutient cette dernière hypothèse et montre que les plaques carotidiennes de patients contiennent de nombreux macrophages apoptotiques non-phagocytés alors que la majorité des cellules apoptotiques observées dans les amygdales des mêmes patients se trouvent à l'intérieur d'un phagocyte ⁵⁴. Ce résultat rend compte d'une meilleure efficacité de

clairance dans cet organe en comparaison avec les plaques d'athérome. De manière expérimentale, des études associent le développement de lésions d'athérosclérose avec un défaut de phagocytose dans des modèles murins génétiquement modifiés. En effet, la délétion des protéines adaptatrices (C1q, TG2, MFG-E8) entre les cellules apoptotiques et les récepteurs présents sur les phagocytes montre une augmentation de la taille des lésions^{59 60 61}. Or, il est montré de manière expérimentale que les macrophages apoptotiques sont de bons substrats pour l'efferocytose⁶². Ainsi, le défaut d'efferocytose des cellules apoptotiques dans l'athérosclérose avancée ne serait pas dû à une absence de marqueurs sur les cellules apoptotiques mais possiblement à une inhibition compétitive de la reconnaissance à cause des LDLox⁶³.

Les autres hypothèses impliquent un clivage des récepteurs tels que MerTK et une diminution de l'expression des protéines adaptatrices comme la lactadhérine^{64 65}. Certaines protéases comme les MMP et ADAM17, impliquées dans l'athérosclérose, sont en effet capable de cliver ces récepteurs empêchant la reconnaissance de la cellule apoptotique par l'efferocyte (Figure 8)^{66 67 68}. Enfin, une autre hypothèse basée sur les phosphoinositides phosphates explique que ces messagers cellulaires doivent s'accumuler dans le phagocyte pour réaliser une efferocytose efficace⁶⁹. La production de ces médiateurs est sous le contrôle d'une famille d'enzymes que sont les PI3K. Or dans les conditions favorisant l'athérosclérose, cette accumulation semble inhibée limitant donc la phagocytose efficace des cellules apoptotiques⁷⁰. Cependant, ces résultats vont à l'encontre d'études récentes montrant que des souris sensibles à l'athérosclérose ont un développement des lésions diminué lorsqu'elles sont traitées avec un inhibiteur spécifique de la PI3K γ ou lorsqu'elles présentent un défaut génétique pour cette même enzyme⁷¹.

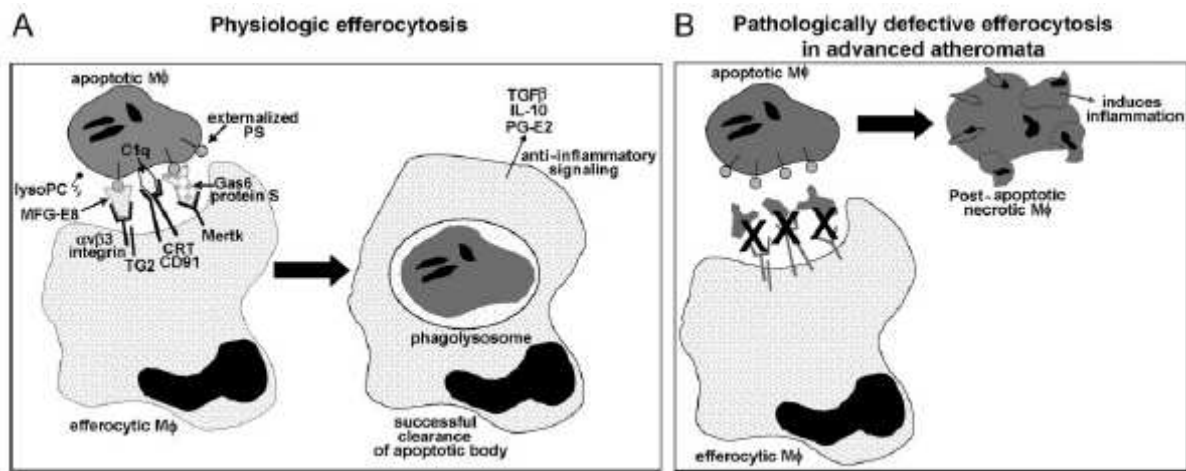


Figure 8 : mécanismes d'efferocytose en condition normale (A) ou dans l'athérosclérose (B)
55

Finalement, les macrophages apoptotiques non éliminés dans les plaques avancées pourraient évoluer vers la nécrose^{72 73} et induire une augmentation du niveau inflammatoire au sein des lésions⁵⁸. En effet, certains travaux associent un défaut d'élimination des cellules apoptotiques à une augmentation de l'inflammation dans l'athérosclérose. Ainsi, il est montré *in vitro* que les LDLox inhibent la phagocytose des cellules apoptotiques et stimulent la production d'IL-6⁷⁴. Par ailleurs, il s'avère que les souris Apoe^{KO} présentent une déficience d'élimination des cellules apoptotiques associée à une augmentation du statut inflammatoire⁷⁵. De plus, des souris développant une auto-immunité (souris gld) sont associées à une accumulation vasculaire des débris cellulaires et une augmentation de l'athérosclérose^{76 77}. La deuxième partie de cette introduction bibliographique récapitule donc l'état actuel des connaissances sur l'implication du système immunitaire dans l'athérosclérose.

II. Le système immunitaire : acteur pro et anti-athérogène.

Le système immunitaire est constitué d'un ensemble de mécanismes biologiques qui permet de reconnaître les éléments appartenant au « soi » et au « non soi » et ainsi de protéger les organismes contre les agressions externes. Au-delà de cette reconnaissance des éléments étrangers, c'est un système qui est aussi éduqué pour éliminer les particules du soi au potentiel immunogène tel que les lymphocytes autoréactifs mais aussi capable de reconnaître le « soi modifié » qui peut dégrader l'intégrité tissulaire comme lors de la nécrose.

Je détaillerai au cours de cette partie le rôle que peut avoir le système immunitaire au cours de l'athérosclérose. J'aborderai dans un premier temps le rôle du système immunitaire dit adaptatif. Il correspond au bras spécifique de la réponse immune, et fait intervenir des cellules spécialisées que sont les lymphocytes capables de reconnaître des séquences peptidiques spécifiques que l'on appelle épitopes antigéniques. Ces séquences sont reconnues grâce à des récepteurs spécifiques issus d'une longue étape de différenciation. Au cours de la pathologie, il est montré un rôle de ce système tant dans un aspect de promotion de la maladie que dans un aspect plus protecteur suivant les types cellulaires mis en jeu (annexe 1). Néanmoins, pour que cette réponse spécifique soit mise en place, il y a nécessité d'une présentation des antigènes par certaines cellules. Ces cellules présentatrices d'antigènes appartiennent au système immunitaire dit inné. Ce système représente la 1^{ère} barrière de défense de l'organisme, elle élimine la majorité des agents pathogènes et ne fait pas intervenir de reconnaissances spécifiques d'antigènes à l'inverse de l'immunité adaptative et des lymphocytes. La reconnaissance implique dans ces types cellulaires des motifs très conservés au cours de l'évolution reconnus par un ensemble de récepteurs multi ligands (annexe 1). Les cellules mises en jeu sont principalement les monocytes-macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Là encore, leur rôle dans l'athérosclérose est dépendant de nombreux

facteurs, je détaillerai les connaissances actuelles sur le rôle des monocytes, des cellules dendritiques ainsi que des macrophages qui ont fait l'objet de mes travaux de thèse. Pour que le système immunitaire soit impliqué, il faut donc qu'il y ait reconnaissance de motifs à caractère potentiellement pathogène. C'est-à-dire que les cellules du système doivent reconnaître des motifs étrangers ou bien du soi modifié voir parfois du soi mimant des agents pathogènes. Plusieurs études ont cherché à isoler ces antigènes reconnus, une théorie infectieuse de l'athérosclérose a même émergé lorsque la présence de bactéries et virus a été retrouvée dans les plaques humaines. Cependant, l'infection de modèles de souris avec ces mêmes agents pathogènes, ainsi que le traitement de patients par des antibiotiques ne démontrent pas d'effets bénéfiques sur l'athérosclérose ne confirmant donc pas cette théorie infectieuse de la pathologie ⁷⁸. D'autres travaux démontrent que dans cette maladie, l'implication des antigènes exogènes est moins importante que le rôle probable des autoantigènes tels que l'hsp60 qui par mimétisme moléculaire est reconnue par le système immunitaire à la place de l'hsp 65 bactérienne ^{79 80 81 82}. Enfin, parmi les autres études visant à déterminer les antigènes reconnus par le système immunitaire, certaines rapportent un rôle antigénique des LDL et des LDLox ^{83 84 85 86}.

A. L'immunité adaptative, lignée lymphoïde.

L'observation d'un infiltrat immunitaire au sein des plaques d'athérome a entraîné de nombreux travaux pour mieux comprendre l'implication du système dans la pathologie et plus particulièrement le rôle des lymphocytes (Figure 9). Ainsi dans les années 1990, diverses équipes montrent, par le biais d'études cliniques sur des endarteriectomies de patients atteints de maladies cardiovasculaires, ou bien par l'analyse de modèles animaux, que les lymphocytes ont un rôle soit athéroprotecteur soit pro-athérogène suivant qu'il s'agit d'une

population cellulaire ou d'une autre^{87 83 88}. En effet, il semble que les lymphocytes T soient plutôt associés à une augmentation de l'athérosclérose alors que les lymphocytes B sont protecteurs. Néanmoins, la réalité est plus complexe et je vais détailler les connaissances actuelles sur l'implication bénéfique ou non des différents types cellulaires connu parmi les lymphocytes.

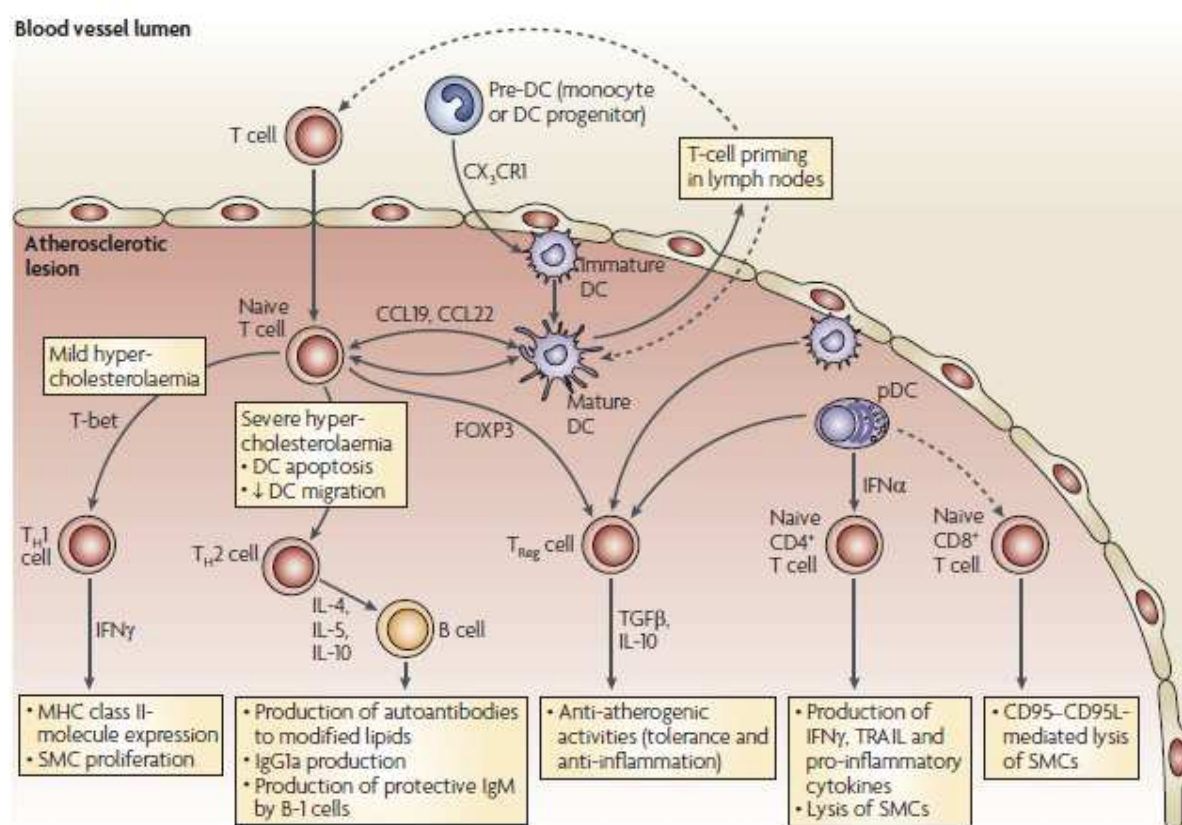


Figure 9 : rôle des différentes sous populations de lymphocytes T dans les plaques d'athérome

1. Les lymphocytes associés à l'augmentation de l'athérosclérose.

a. Les lymphocytes T helper de type 1 : Th1.

Les lymphocytes T helper (Th) sont des cellules T largement impliquées dans la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire. Elles vont grâce à leur récepteur (le TCR) reconnaître des peptides antigéniques présentés dans un contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II). Ces cellules dotées d'un corécepteur, le CD4, vont reconnaître ce CMH II et, suivant le type de peptide présenté ainsi que l'environnement dans lequel elles se trouvent, répondre par la sécrétion d'un ensemble de médiateurs ayant pour but d'aider une réponse cellulaire inflammatoire ou bien d'aider une réponse humorale médiée par les lymphocytes B. C'est donc par ce rôle d'aide à d'autres réponses immunitaires qu'est venu la dénomination de T helper ou auxiliaire. Plusieurs sous populations de Th existent parmi lesquelles je parlerai des Th1 dans cette partie, mais aussi plus en aval dans ce manuscrit des Th2 et des Th17.

Les lymphocytes Th1 se différencient à partir d'une cellule dite Th0 qui se trouve dans un état naïf. En présence d'IL-12, cette cellule Th0 va s'engager vers un phénotype dit Th1 caractérisé par la capacité de production d'un ensemble de médiateurs impliqués dans l'inflammation en premier desquels se trouve l'interféron gamma (IFN γ).

Il est retrouvé au sein des plaques humaines d'athérosclérose, la présence de cette cytokine signant ainsi un rôle des Th1 dans la pathologie. Il semble de plus que la présence de cette molécule soit associée à un ensemble de facteurs aggravant la pathologie tels que, l'immunité et l'inflammation (cellulaire ou sécrétoire), des modifications de la matrice extracellulaire et une activation endothéliale⁹⁰.

Ainsi, les études sur des modèles animaux présentant une déficience en IFN γ ou bien une déficience dans son récepteur montrent une diminution des lésions murines d'athérome. A

l'inverse, les expériences basées sur des injections de la cytokine montrent une augmentation des plaques^{91 92 93 94}. D'autres molécules associées au phénotype Th1 de la réponse adaptative cellulaire ont fait l'objet d'investigations confirmant le rôle pro-athérogène de ces cellules. L'injection d'IL-12 ou bien l'utilisation d'anticorps neutralisant cette cytokine prouvent l'implication des Th1. En effet, cette molécule en partie impliquée dans la différenciation Th1 augmente la taille des lésions lorsqu'elle est injectée à des animaux et inversement, sa neutralisation inhibe l'athérosclérose^{95 96 97}. Toutes ces études sont basées sur la modification de médiateurs circulant qui prennent part à l'ensemble de la réponse Th1. Cependant, ces molécules pouvant être produites par d'autres types cellulaires, ceci ne prouve pas totalement l'action athérogène des Th1. L'inhibition d'expression d'un facteur de transcription nécessaire au développement des lymphocytes Th1 (T-bet) entraîne chez des souris hypercholestérolémiques LDLr^{KO} une diminution de la maladie traduisant encore une fois un rôle pro-athérogène des Th1⁹⁸. Enfin plusieurs études agissant directement sur l'augmentation ou la suppression de ces cellules montrent les mêmes conclusions. Ainsi, Zhou rapporte que des souris SCID immunodéficientes en cellules B et T présentent une diminution des lésions avec un infiltrat réduit en macrophages et en cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (CMH II⁺). Lorsque chez ces souris un transfert en cellules T CD4⁺ est réalisé, une augmentation des plaques apparaît, associée à une augmentation de l'IFN γ ⁹⁹. De même, l'injection de pentoxifylline (PTX), un inhibiteur de phosphodiesterase, à des souris athéroscléreuses entraîne une diminution des lésions et une diminution de cellules T IFN γ ⁺¹⁰⁰. Comme les lymphocytes Th1 sont retrouvés au sein des plaques d'athérome, que ces cellules sont actives et provoquent une inflammation chronique dans la pathologie, cela signifie qu'elles doivent reconnaître des épitopes antigéniques présents dans les lésions. Le rôle important des LDLox, mentionné dans la 1ère partie de ce manuscrit, suppose que ces lipoprotéines modifiées sont les antigènes reconnus. Ainsi lorsque des lymphocytes T CD4⁺

de souris immunisées avec le MDA-LDL sont transférés dans des souris immunodéficientes SCID, une augmentation des lésions avec une augmentation des infiltrats cellulaires CD4⁺ et CMH II⁺ est observée. Ces mêmes cellules présentant en culture des sécrétions d'IFN γ , les auteurs concluent que ces lymphocytes CD4⁺ sont de type Th1 et responsables de cet effet pro-athérogène⁸⁴.

Néanmoins, les Th1 ne sont pas les seules cellules T impliquées dans le développement de la maladie. En effet sous l'action de l'IL-17, les Th0 peuvent se différencier en Th17. Leur rôle dans l'athérosclérose semble cependant plus controversé.

b. Les lymphocytes T helper de type 17 : Th17.

De la même façon que la balance Th1/Th2 est contrôlée par les niveaux de cytokines IL-12/IL-4, il existe une autre balance, la balance Th17/Treg. Les T régulateurs (Treg) sont définis phénotypiquement comme CD4⁺ CD25^{high} FoxP3⁺. Ils sont produits en présence de TGB β et ont un rôle de régulation de l'inflammation en inhibant l'action des Th1 soit par l'intermédiaire de cytokines soit par des contacts cellulaires. Lors de cette voie de différenciation, si l'environnement contient de l'IL-6, ces lymphocytes ne vont pas se transformer en Treg mais en Th17. Les lymphocytes Th17 ont la propriété de sécréter un ensemble de médiateurs tels que l'IL-17, l'IL-21, l'IL-23, et sont rapportés comme impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires à dimensions auto-immunes telles que le lupus érythémateux ou bien la sclérose en plaque. Dans le cadre de l'athérosclérose, des études à partir de plaques humaines ou de modèles animaux révèlent des fonctions distinctes. Ainsi, l'expression de l'IL-17 est retrouvée dans des plaques humaines avancées associées soit à la présence d'infiltrats T soit de cellules musculaires lisses et endothéliales^{101 102}. De plus, l'ajout d'agonistes de LXR dans des cultures de lymphocytes T humain montre que lors de l'activation LXR, la différenciation Th17 est diminuée. Or il est établi que LXR chez

l'homme comme chez la souris présente des effets anti-athérogène ¹⁰³. Ces données soutiennent l'hypothèse que la voie Th17 est pro-athérogène. Néanmoins, afin de mieux comprendre le rôle des Th17 et de l'IL-17 dans l'athérosclérose, des travaux sur modèles animaux ont été réalisés. On retrouve donc dans la littérature que des souris hypercholestérolémiques Apoe^{KO} susceptibles au développement de l'athérosclérose présentent une augmentation des ARNm de RORγt et de l'IL-17 au sein des lésions. De même, une augmentation circulante de l'IL-17 et une diminution des Treg est observée en comparaison avec des souris non susceptibles à la maladie (Apoe WT) et de même fond génétique C57BL/6 ¹⁰⁴. D'autres travaux sur le modèle Apoe^{KO} indiquent le même effet pro-athérogène de l'IL-17 dans diverses conditions telles que sous régime hypergras (HFD), après injection d'angiotensine II pour induire l'athérosclérose ou bien lors de ligatures carotidiennes. Cependant, l'étude de Madhur montre que dans certains cas l'IL-17, et plus précisément l'IL-17A n'a pas d'effet sur les plaques d'athérome. En effet, l'induction de la pathologie par injection de l'angiotensine II ne montre pas d'effets différents entre des souris invalidées pour l'IL-17A et des souris sauvages. De même, en régime chow, il semble que l'IL-17F compense l'absence d'IL-17A. Ainsi l'implication des Th17 et de l'IL-17 est encore controversée ^{105 106 107}. Tous ces résultats sont basés sur une approche d'inhibition de la voie IL-17.

L'approche inverse basée sur l'augmentation indirecte des Th17 dans les travaux menés en 2009 par Taleb *et al* sur des souris déficientes pour SOCS3 montre que les Th17 sont athéroprotecteurs. SOCS3 est un inhibiteur de STAT3, molécule impliquée dans la signalisation de l'IL-6. Ainsi, des souris invalidées pour SOCS3 présentent un taux augmenté de Th17 et une diminution des lésions d'athérosclérose chez les souris Apoe^{KO} en HFD ¹⁰⁸. Néanmoins, cette voie n'est pas exclusive des Th17 et impacte de nombreuses autres molécules, et cette étude est réalisée dans un contexte particulier d'inflammation et de

cholestérolémie. Il apparaît donc que le rôle de ces lymphocytes récemment découvert dans la pathologie de l'athérosclérose soit encore controversé et nécessite de plus amples investigations. La tendance actuelle les considérant comme pro-inflammatoires.

c. Les lymphocytes T natural killer : NKT.

Parmi les lymphocytes T, certains possèdent un récepteur semi-invariant formé d'éléments constants que sont par exemple le segment V α 14 chez la souris ou V α 24 pour l'homme (V pour variability) associé au segment J α 18 anciennement J α 281 (J pour joining). Ces lymphocytes possèdent aussi des marqueurs de cellule « natural killer » (NK) comme le NK1.1 et tirent donc leur nom de lymphocytes NKT de par la double expression de ces molécules. Le développement et la régulation de cette famille cellulaire que sont les cellules NKT est largement détaillé dans certaines revues ainsi que leurs implications dans la promotion ou la tolérance immunitaire^{109 110}.

Ces cellules ont la possibilité de reconnaître des antigènes qui sont présentés dans un contexte spécial, le contexte du CD1d. Cette molécule est dénommée CMH I non classique, elle permet la présentation d'antigènes de types lipidiques ou glycolipidiques. On imagine donc bien l'importance probable de ces types cellulaires dans une pathologie telle que l'athérosclérose où le facteur de risque majeur reste l'hypercholestérolémie.

Plusieurs groupes ont donc travaillé sur le rôle des cellules NKT dans la pathologie. Ces cellules sont retrouvées au sein des plaques grâce à des analyses en microscopie à fluorescence et en microscopie confocale, leur concentration est aussi corrélée avec la sévérité des lésions. Expérimentalement, les produits libérés lors de l'activation de ces cellules montrent une action pro-athérogène par le biais d'une augmentation de l'angiogénèse¹¹¹. D'autres études basées sur la manipulation des cellules NKT dans les modèles murins athérogènes montrent que l'implication de ce type cellulaire est plus complexe qu'il n'y paraît.

En effet suivant les sous-ensembles cellulaires touchés, l'initiation ainsi que la progression des lésions est variable. Des souris déficientes pour le CD1d en fond hypercholestérolémique LDLr^{KO} présentent une diminution de la formation des lésions mais pas d'effet sur des phases plus tardives ¹¹². Les mêmes études sur des souris CD1d^{KO} Apoe^{KO} montrent aussi une diminution des lésions, le traitement des souris CD1d^{+/+} Apoe^{KO} avec un activateur des NKT via le CD1d augmente l'athérosclérose en association avec un ensemble de sécrétions cytokiniques ¹¹³. La diversité des cytokines produites par ce type cellulaire traduit bien cette variabilité sur l'athérosclérose, puisque ces cellules peuvent aussi bien produire de l'IFN γ connu comme pro-athérogène comme nous l'avons mentionné précédemment, mais d'autres cytokines que sont l'IL-4 et l'IL-10 dont les propriétés sont soit controversées pour l'IL-4 soit antiathérogènes pour l'IL-10 comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

La réponse immunitaire cellulaire n'est pas la seule réponse adaptative mise en jeu dans l'athérosclérose. En effet, l'autre réponse spécifique, dite humorale puisque faisant intervenir les anticorps circulants, est impliquée dans la pathologie.

Ces anticorps sont produits suite à un enchainement complexe d'évènements allant de l'activation de lymphocytes B naïfs par reconnaissance d'antigènes, à leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Il existe 5 classes d'anticorps, les IgA ayant une implication au niveau intestinal, les IgD éléments du récepteur des cellules B (BCR), les IgE ayant un rôle dans les allergies, les IgM qui sont éléments du BCR mais aussi les premiers anticorps produits en réponse aux infections, et enfin les IgG qui sont les anticorps les plus représentés, plus spécifiques et de meilleures affinités. Dans l'athérosclérose, il est retrouvé des anticorps au sein des plaques et les titres de ces anticorps sont corrélés avec la maladie dans diverses études cliniques chez l'homme. Cependant, il faut différencier les anticorps de type IgG et ceux de type IgM dit naturel produits par un sous-type de lymphocyte B dit B2 ou

B1 respectivement. En effet, il semble que l'impact des 2 types cellulaires B soit différent dans la pathologie avec un rôle potentiellement pro-athérogène pour les LB2 comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, et un rôle protecteur apporté par les LB1 que nous détaillerons ensuite.

d. Les lymphocytes B de type 2 : LB2.

Dès les années 1990, lors de l'émergence du rôle du système immunitaire dans l'athérosclérose, des groupes ont travaillé sur la possible implication des lymphocytes B. La découverte au sein des plaques de la présence de ces cellules associées à la détection intra plaque d'anticorps renforçant alors l'idée qu'une réponse humorale a lieu ¹¹⁴. L'immunisation avec l'antigène MDA-LDL montre une diminution des lésions d'athérosclérose dans les souris Apoe^{KO} en comparaison des souris injectées avec du PBS. Cet effet protecteur semble corrélé avec une augmentation d'anticorps anti MDA-LDL détectés par ELISA ¹¹⁵. Ces travaux suggèrent l'idée que les anticorps dirigés contre des particules athérogènes présentent un aspect protecteur dans la maladie. Cependant, des travaux basés sur l'injection du rituximab, un anti CD20 tendent vers une explication contraire. Le CD20 est une molécule présente sur les lymphocytes B qui a pour rôle de participer à l'activation de la cellule. En inhibant son action, on empêche les LB de s'activer et de produire des anticorps. Ainsi, les travaux utilisant un anti CD20 font état d'une diminution des lésions chez les souris hypercholestérolémiques Apoe^{KO} en western diet ou chow diet, ainsi que dans les souris LDLr^{KO}. Ce traitement déplétant les LB matures dans le sang, la rate et le péritoine, les auteurs concluent que les LB ne sont pas obligatoirement protecteurs. Néanmoins, les dosages des anticorps après traitement avec l'anti CD20 ou un anticorps contrôle montrent que les IgG sont nettement diminués par l'injection de l'anti CD20 alors qu'en rapport les IgM et notamment les IgM naturel T15/EO6 sont faiblement diminués. Ainsi, il apparaît que

l'utilisation d'un anticorps anti CD20 a un effet important sur les lymphocytes B2 et leurs IgG associées comparativement à un impact faible sur les LB1 sécrétant les IgM naturels. De plus, les auteurs, en analysant la composition des plaques, notent une diminution de l'infiltrat lymphocytaire T. La notion qui émerge de ces expériences est que les LB2 et les LT réalisent une coopération lors des réponses immunitaires inflammatoires contre des antigènes dit thymo-dépendants, ce qui semble être en accord avec les données de l'immunologie fondamentale. Enfin, lors de l'analyse des cytokines produites dans les animaux contrôles ou injectés avec l'anticorps anti CD20, les auteurs découvrent que la réduction du nombre de LB2 et des IgG sécrétés est associée à une diminution de l'IFN γ et une augmentation de l'IL-17A. Ils concluent alors que les effets athéroprotecteurs de l'inhibition des LB2 sont reliés à une déviation de la réponse Th1 vers une réponse Th17 protectrice d'après une autre étude de leur équipe ^{116 108}. Or des travaux précédents de transfert de LB dans des souris receveuses ayant été splénectomisées montrent un effet protecteur des lymphocytes B ¹¹⁷. Conclure sur le rôle athérogène ou protecteur des LB2 est donc délicat. Cependant, les travaux réalisés par Ait-Oufella *et al* sont à relier aux travaux de Kyaw *et al* qui démontrent plus précisément l'effet pro-athérogène des LB2 et un possible effet protecteur des LB1 ¹¹⁸. Ces résultats sont encore controversés et nécessitent des confirmations ¹¹⁹.

2. Les lymphocytes associés à la protection de l'athérosclérose.

Bien que les premières études basées sur une déficience génétique du système immunitaire adaptatif (souris Rag^{KO} ou SCID) ont révélé un rôle pro-athérogène des lymphocytes ^{88 99}, des expériences de splénectomies sur des animaux hypercholestérolémiques montrent que, lors de l'athérosclérose, la réponse spécifique peut avoir un rôle protecteur ¹¹⁷.

a. Les lymphocytes T helper de type 2 : Th2.

Lors de la réponse immunitaire cellulaire, nous avons vu précédemment qu'il existe une balance dans la différenciation d'un lymphocyte Th0 en Th1 ou bien Th2, ceci suivant l'environnement cytokinique (IL-12 ou IL-4). Les Th1 étant pro-athérogènes, il a d'abord été imaginé que les Th2, présentant des capacités anti-inflammatoires par la production d'IL-4 et d'IL-10, possèderaient un rôle de protection dans la pathologie.

Les expériences de transferts de LT dans des souris dépourvues de rate démontrent, malgré un effet pro-athérogène des Th1, qu'il existe dans les LT une population protectrice, puisque comparativement aux souris splénectomisées, les souris recevant des LT ont des lésions diminuées à un niveau équivalent à celui des souris témoins ¹¹⁷. De plus, l'étude de l'évolution de la maladie chez des souris Apoe^{KO} montre une augmentation des cellules Th1 au détriment des Th2 ¹⁰⁰.

Afin de confirmer ce potentiel rôle protecteur des Th2, plusieurs groupes ont travaillé sur l'implication d'une des cytokines responsable de la différenciation des Th2 et produite par ces cellules : l'IL-4.

L'analyse des plaques humaines ne révèle la présence ni d'IL-4 ni d'IL-5, une autre cytokine Th2 ¹²⁰. Il semble donc que les Th2 ne soient pas impliqués dans la formation ou la réduction des lésions. Cependant, l'analyse de souris IL-4^{KO} montre que les lésions d'athérome sont diminuées suggérant un rôle pro-athérogène de cette cytokine et des lymphocytes producteurs associés ^{96 121}. A l'inverse, l'observation que des souris Balb/c ne sont pas susceptibles à l'athérosclérose suggère que les Th2 sont protecteurs. En effet, les souris appartenant à ce fond génétique ont un phénotype pro Th2 en comparaison des souris C57Bl/6 qui sont athérosensibles et pro Th1 ¹²². Des travaux similaires ont été réalisés dans des souris athérosensibles Apoe^{KO} dans les fonds génétiques soit C57BL/6 soit Balb/c. Les animaux,

après administration d'un régime hypercholestérolémique, ont fait l'objet d'une caractérisation de la polarisation de la réponse Th, d'une identification des classes d'anticorps anti LDLox produits et d'une quantification des lésions. Les auteurs révèlent que les souris Apoe^{KO} C57BL/6 présentent une athérosclérose augmentée, une polarisation Th1 et des anticorps IgG2a en comparaison des souris Balb/c qui ont une polarisation Th2 et des IgG1. Ceci conforte l'hypothèse pro-athérogène des Th1 et protectrice des Th2 ¹²³. De plus, les travaux de transfert de cellules spléniques T de souris immunisées avec un antigène non relevant montrent une production accrue d'IL-5 et une taille de lésions inférieure à des souris immunisées avec le MDA-LDL. Ceci suggère encore une action protectrice des Th2 ⁸⁴. Enfin, l'IL-33, une autre cytokine connue comme associée au phénotype Th2 semble diminuer l'athérosclérose ¹²⁴.

Néanmoins, King *et al*, qui ont précédemment décrit en 2002 les lymphocytes Th2 et l'IL-4 comme pro-athérogène ¹²¹, montrent après de nouvelles expériences que l'IL-4 n'a pas d'effet réel sur la pathologie. Ainsi, en l'état actuel des connaissances, un consensus semble se dessiner sur l'absence d'effet des Th2, les diminutions des lésions observées dans les expériences mentionnées ci-dessus étant plutôt à imputer au rôle protecteur probable des LB via l'IL-5 et l'IL-33 ainsi qu'à la production d'IL-10.

b. Les lymphocytes T régulateurs de type 1 : Tr1.

Parmi les lymphocytes T, il a été découvert des populations aux propriétés dites régulatrices. Ces populations sont capables de réduire l'inflammation et la réponse Th1 soit par la production de cytokines anti-inflammatoires, soit par des contacts cellulaires induisant l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes Th1.

Les Tr1 appartiennent à cette population de LT dit régulateurs. Ils agissent majoritairement par la production d'IL-10. Leur rôle dans l'athérosclérose est peu détaillé dans la littérature,

néanmoins, deux équipes ont prouvé une action protectrice en adéquation avec leur fonction principale. Ainsi, la production et la stimulation in vitro de lymphocytes Tr1 reconnaissant spécifiquement l'ovalbumine entraînent la sécrétion d'IL-10. Lorsque les auteurs réinjectent ces lymphocytes dans des souris puis immunisent celles-ci avec l'ovalbumine, ils observent une diminution de la taille des lésions thoraciques et du sinus aortique. Une diminution de la production d'anticorps de type IgG2a, d'IFN γ et de prolifération est aussi notée. La conclusion est donc que ces lymphocytes sont capables de réduire la réponse Th1 inflammatoire lorsqu'ils sont stimulés par leur antigène ¹²⁵. Plus récemment, un autre groupe montre que l'immunisation intranasale d'animaux avec une protéine de fusion contenant un fragment de l'apolipoprotéine B 100 comme peptide antigénique entraîne une diminution de la taille des lésions. Cette diminution étant liée à une prolifération de lymphocytes T CD4⁺ IL-10⁺ de type Tr1 ¹²⁶.

Il est donc admis aujourd'hui que ces lymphocytes sont protecteurs dans la maladie.

Un autre type nettement plus étudié de lymphocytes T régulateurs existe. Il s'agit des T régulateurs dit naturels dont je vais détailler l'implication dans l'athérosclérose ci-après.

c. Les lymphocytes T régulateurs naturels : Treg.

Les lymphocytes Treg naturels de phénotype CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} FoxP3⁺ sont produits en réponse au TGF β comme nous l'avons vu précédemment dans le chapitre traitant de la balance Treg/Th17. Les Th17 étant considérés comme pro-inflammatoires, et les capacités suppressives des Treg suggèrent que ce type cellulaire est athéroprotecteur. Comme nous l'avons vu pour les lymphocytes Th2, le fait que les Th1 (leur opposant dans la balance Th1/Th2) soit pro-athérogène n'implique pas obligatoirement que les Th2 présentent l'effet inverse. Donc, dans la balance Th17/Treg, l'effet pro-athérogène des Th17 ne permet pas d'affirmer que les Treg sont protecteurs. De plus, le rôle pro-athérogène des Th17 n'est pas

totalement établi. Ainsi, connaître le rôle des Treg naturels apparaît crucial dans le développement possible de nouvelles thérapeutiques. Chez l'humain, les études sont controversées. En effet certains groupes ayant réalisé des expériences de corrélation entre le taux circulant de lymphocytes T régulateurs naturels $CD4^+ CD25^{hi} CD127^{low}$ et l'atteinte d'artères coronaires ou carotidiennes, indiquent que ces cellules ne semblent pas impliquées dans ces pathologies, ou du moins ne représentent pas un bon marqueur prédictif ¹²⁷. A l'inverse, d'autres expériences sur le rejet de greffes des artères par artériosclérose montrent que l'expansion de Treg entraîne une prévention de ces rejets avec une diminution de la sclérose associée. Ceci indique alors un possible effet protecteur des Treg qui semble plus en accord avec leur fonction suppressive ¹²⁸. De même, dans des plaques humaines, il est retrouvé une présence plus faible des cellules T FoxP3⁺ en comparaison à des biopsies de peaux normales ou inflammatoires (psoriasis). Ces mêmes travaux indiquent aussi qu'au cours de l'athérosclérose, bien que le nombre de cellules T totale augmente, le pourcentage de cellules FoxP3⁺ parmi ces lymphocytes ne varie pas, signifiant que ces cellules ne sont pas pro-athérogènes ¹²⁹. Les expériences sur modèles animaux nous permettent d'obtenir de plus amples informations sur l'implication des Treg dans l'athérosclérose. Ainsi, la comparaison de souris C57BL/6 avec des souris de même fond génétique mais athéro-sensible Apoe^{KO}, montre qu'au cours de la progression de la maladie, les cellules T FoxP3⁺ augmentent en même temps que la taille des lésions. Plusieurs explications sont possibles, soit ces cellules participent activement à la croissance de la plaque d'athérome ainsi qu'à sa déstabilisation, soit ces Treg sont recrutés localement pour tenter d'inhiber la réponse Th1 pro-athérogène associée à la pathologie ¹³⁰.

Pour que leur fonction suppressive puisse se réaliser, ces lymphocytes Treg naturels nécessitent des signaux de costimulations apportés par les interactions entre les molécules CD28 et CD80/86. Ainsi, l'analyse de souris déficientes pour tout ou partie de ces molécules

montre une forte diminution du nombre circulant de lymphocytes Treg et une incapacité de régulation de l'inflammation Th1. Lorsque ces souris sont soumises au développement de l'athérosclérose, une augmentation dans la taille des lésions est observée. Le transfert de splénocytes T normaux ou dépourvu de CD28 dans des souris receveuses immunodéficientes Rag2^{KO} montre les mêmes résultats confirmant l'effet athéro-protecteur des Treg¹³¹. D'autres expériences d'injections de Treg ou bien de T CD4⁺ CD25^{neg} dans des souris Apoe déficientes montrent une diminution des plaques d'athéromes lorsque les souris sont injectées avec ces cellules régulatrices suggérant encore une fois la capacité de réduction de la pathologie liée à ce type cellulaire¹³². Une approche similaire de promotion de la population des Treg par injection d'IL-2 confirme ces propriétés puis que les souris atherosensibles injectées ont une diminution des lésions précoces et avancées^{133 134}. Enfin, l'administration orale d'anticorps anti-CD3 à des souris sensibles montre une diminution des lésions, associée à une augmentation de cellules CD25⁺ FoxP3⁺ et LAP⁺ qui signe la fonction régulatrice. De même ces souris présentent une augmentation du TGFβ et, lorsqu'elles sont traitées avec un anticorps neutralisant cette cytokine, l'effet protecteur est perdu¹³⁵. Une étude récente soutient ce rôle du TGFβ, les auteurs rapportent que la présence des Treg comme cellule anti-athérogène réduirait la formation des cellules spumeuses via l'IL-10 et le TGFβ¹³⁶. Il apparaît donc dans les 2 balances Th1/Th2 et Th17/Treg, que seul le rôle athérogène des Th1 et protecteur des Treg est clairement défini.

d. Les lymphocytes B de type 1 : LB1.

Comme mentionné dans la partie précédente traitant du rôle des LB2, depuis les années 2000, les expériences sur l'importance du système immunitaire adaptatif ont impliqué les lymphocytes B. Ainsi, des souris SCID déficientes en LT et en LB présentent une diminution des lésions supposant un rôle pro-athérogène de l'immunité spécifique⁹⁹. Plus tardivement,

des expériences portant plus particulièrement sur les LB montrent que ceux-ci semblent protecteurs. En effet, le transfert de moelle osseuse de souris déficientes pour les LB ($\mu\text{MT}^{\text{neg/neg}}$) dans des souris receveuses athéro-sensibles irradiées entraîne une augmentation des lésions comparativement à un transfert de moelle osseuse de souris sauvages¹³⁷. Cet effet est associé à une diminution de production des anticorps totaux et plus particulièrement des anticorps dirigés contre les LDLox. De même, les expériences de splénectomies et de reconstitutions en LB des souris Apoe^{KO} démontrent un rôle protecteur des LB¹¹⁷. Néanmoins, comme mentionné précédemment, les travaux impliquant l'injection d'anticorps anti CD20 indiquent que les LB sont plutôt athérogènes¹¹⁶. Toutefois, ces travaux ne démontrent pas quel type de lymphocytes B est impliqué dans les manipulations réalisées. Alors que les LB2 semblent pro-athérogènes, il apparaît que les LB1 présentent l'effet inverse. Les LB1 sont connus comme producteurs des anticorps IgM naturels. Karvonen *et al* et Tsimikas *et al* montrent respectivement en 2003 et en 2007 que les IgG sont corrélés positivement avec l'augmentation de l'athérosclérose alors que les IgM ont une relation inverse^{138 139}. Parmi les IgM naturels, un type spécialisé semble impliqué dans l'athérosclérose. Ce type est capable de reconnaître la phosphorylcholine (PC) qui est présente sur les cellules apoptotiques, sur la membrane des bactéries comme *streptococcus pneumoniae* mais aussi sur les LDLox. Ainsi des souris athérosensibles immunisées avec la PC développent moins d'athérosclérose que des souris injectées avec du PBS. Parallèlement une augmentation des IgM anti PC (T15/EO6) est observée suggérant que cette immunoglobuline est protectrice¹⁴⁰. L'observation au cours de la protection médiée par les LB, d'une augmentation de l'IL-5 pose la question du rôle de cette cytokine. Or, il est démontré que la protection induite lors de l'immunisation de souris avec des MDA-LDL entraîne une augmentation de l'IL-5 ainsi qu'une augmentation des LB1 et de la sécrétion des IgM T15/EO6¹⁴¹. Le lien semble donc établi entre la présence d'un type particulier de

lymphocytes B (B1) et les cytokines permettant leur activation et leur production d'IgM. Récemment, une étude confirme cette idée sur des souris splénectomisées. Les auteurs montrent que la splénectomie des animaux réduit considérablement les niveaux de lymphocytes B1 dans la cavité péritonéale (lieu privilégié des LB1) alors que les LB2 et les autres populations lymphocytaires péritonéales ne sont pas modifiées ¹⁴². La perte de l'effet protecteur des LB1 en faveur du rôle pro-athérogène des LB2 au cours d'une splénectomie peut donc expliquer les différences sur l'athérosclérose lorsque l'on compare ces résultats avec ceux obtenus sur des animaux immunodéficients (SCID ou Rag^{KO}) qui présentent des lésions diminuées ^{99 117}. De plus, lorsqu'un transfert de LB1a est réalisé dans des souris receveuses splénectomisées, il est observé une reconstitution de la cavité péritonéale avec ce type lymphocytaire alors que le transfert de LB2 n'aboutit pas au même effet. Associé à ce transfert et cette reconstitution, les souris présentent une athérosclérose diminuée, une diminution du cœur nécrotique et une diminution des cellules apoptotiques. Comme les LB1a sont producteurs des IgM naturels, que ces mêmes immunoglobulines sont capables de reconnaître la phosphorylcholine présente sur les cellules apoptotiques et comme cette apoptose est diminuée lors du transfert des LB1a, les auteurs ont voulu identifier l'implication de cet anticorps dans la réduction de l'athérosclérose dans leurs souris. Les dosages dans le plasma et les lésions des IgM naturels montrent que ces anticorps sont augmentés dans les souris ayant reçu des LB1a comparativement aux souris transférées soit au PBS soit avec des LB2 ¹¹⁸. De plus, une revue récente regroupe l'ensemble des données connues sur le rôle protecteur et régulateur des IgM naturels probablement via des mécanismes se rapprochant des récepteurs « éboueurs ». Les auteurs émettent 2 hypothèses possibles d'action de la clairance des corps apoptotiques via les IgM. Soit les IgM ayant fixé les débris par la phosphorylcholine sont internalisés par les phagocytes mononucléés grâce aux interactions avec les récepteurs aux parties constantes des immunoglobulines (R_{FC}), soit les molécules du

C1q se fixent sur les IgM liées aux cellules mortes et ce complexe est phagocyté via les interactions du C1q et de son récepteur ¹⁴³. Il apparaît donc clair que les LB2 comme décrit précédemment sont plutôt pro-athérogènes alors que les LB1 possèdent la capacité de protection initialement décrite pour l'ensemble des LB via l'implication des IgM naturels.

B. L'immunité innée, lignée myéloïde.

Comme rapporté dans la partie précédente, dans certaines pathologies inflammatoires chroniques telle que l'athérosclérose, le rôle de l'immunité adaptative est important. Or, l'activation de cette réponse immunitaire est conditionnelle à l'établissement d'une réponse innée antérieure. Le rôle de ce bras du système immunitaire est double. Il a pour fonction de combattre les agents pathogènes extérieurs ou intérieurs de façon non spécifique par reconnaissance des PAMPs via les PRRs comme décrit auparavant mais aussi de permettre la présentation antigénique aux lymphocytes. Plusieurs types cellulaires composent ce système inné. On parlera des cellules dendritiques qui représentent la cellule clé de l'interface entre immunité innée et adaptative, on verra que son rôle dans l'athérosclérose commence à être étudié notamment dans le cadre de l'apoptose. Un autre type cellulaire majoritaire présente une fonction cruciale dans l'immunité innée. Il s'agit de la lignée du monocyte/macrophage. Le macrophage tissulaire possède en effet une fonction de cellule phagocytaire essentielle pour la clairance des débris cellulaires, mais aussi pour la sécrétion d'un environnement cytokinique clé dans l'orientation des différentes réponses immunitaires. Nous verrons de façon plus détaillée l'implication des macrophages dans l'athérosclérose puisqu'il s'agit d'une des cellules les plus analysée dans ce processus et qu'une partie de mes travaux de thèse s'est focalisée sur cet aspect.

1. Les monocytes : précurseurs myéloïdes et senseurs circulants.

Les monocytes sont des leucocytes circulants qui jouent un rôle clé dans les réponses inflammatoires et essentiellement dans la réponse immunitaire innée. Ils sont parfois impliqués dans des pathologies inflammatoires telles que l'athérosclérose. Chez l'homme, ils représentent entre 5 et 10% des leucocytes sanguins, et sont différenciés en 3 sous populations sur la base de l'intensité d'expression des marqueurs CD14 et CD16 (corécepteur du TLR4 et récepteur à la partie constante des immunoglobulines respectivement). Ainsi on distingue les monocytes classiques ($CD14^+/CD16^{neg}$), les monocytes intermédiaires dont le rôle est encore peu connu ($CD14^+/CD16^+$) et les monocytes non classiques ($CD14^{neg}/CD16^+$) autrement appelés inflammatoires et capables de produire de fortes quantités de $TNF\alpha$ ¹⁴⁴.

Chez la souris, les monocytes représentent environ 4% des leucocytes circulants. Ils sont séparés en 2 sous populations définies par l'expression du CD115 (M-CSFR) mais aussi du Ly6C (ou Gr1 qui correspond à l'association du Ly6C et du Ly6G). On trouve donc les monocytes $CD115^+ Ly6C^{hi}$ ($Gr1^{hi}$) et les monocytes $CD115^+ Ly6C^{low}$ ($Gr1^{low}$). Dans la suite du mémoire nous utiliserons la dénomination $Gr1^{hi}$ ou $Gr1^{low}$.

Ces cellules sanguines sont équipées d'un large panel de récepteurs appartenant à la famille des PRR qui permettent notamment de reconnaître divers motifs des microorganismes, des lipides ou bien des cellules apoptotiques. Ainsi cette reconnaissance entraîne leur activation et la production de médiateurs nécessaires aux réponses immunitaires ^{145 146}. Les études sur les monocytes humains se limitent aux aspects phénotypiques et quantitatifs. Les avancées dans la compréhension du recrutement et dans la fonction des différentes populations monocytaires viennent donc de l'utilisation de modèles animaux permettant la suppression de certains récepteurs de chimiokines. La présence de certains de ces récepteurs sur des populations cellulaires chez l'homme comme chez la souris permet parfois une extrapolation des résultats

des modèles murins vers l'homme. Néanmoins, de nombreuses différences persistent et la corrélation entre monocytes humain et murins est plus compliquée qu'il n'y paraît ¹⁴⁷.

Le rôle probable des monocytes dans diverses pathologies tient du fait que certains de leurs marqueurs sont retrouvés associés aux maladies. L'exemple de l'athérosclérose montre leur présence dans des plaques à la fois humaines et expérimentales.

Chez la souris, il est montré que lors d'une hypercholestérolémie induite par la suppression soit du récepteur aux LDL, soit du gène codant pour l'Apolipoprotéine E (LDLr^{KO} ou Apoe^{KO}), les monocytes Gr1^{hi} sont augmentés. Cette monocytose s'accompagne d'une sensibilité accrue à la maladie ^{148 149}. De plus, un défaut d'efferocytose lors de l'athérosclérose a été associé récemment à une augmentation de ces mêmes monocytes Gr1^{hi} ¹⁵⁰. Dans le même temps, lors de la pathologie, il est observé une diminution de la différenciation des monocytes Gr1^{hi} en Gr1^{low}, probablement avec une implication de l'apoptose ¹⁵¹. Ces travaux de caractérisation sont confirmés par l'analyse de modèles présentant une déficience dans les populations monocytaires par mutation du gène codant pour le M-CSF (souris op/op) ¹⁵².

Les monocytes sont capables de s'infiltrer dans les plaques via l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs ^{153 154}. Il semble que chaque sous type de monocytes soit capable de traverser l'endothélium par des voies différentes mais la contribution réelle de chaque type dans l'aggravation ou la résolution de la maladie reste encore floue. On peut malgré cela émettre des hypothèses sur le rôle des Gr1^{hi} et des Gr1^{low}. Ainsi, il apparaît que les monocytes Gr1^{hi} nécessitent la présence des récepteurs CCR2, CCR5 et CX3CR1 pour pouvoir extravaser et pénétrer l'endothélium vasculaire ¹⁵¹, alors que les Gr1^{low} semblent recrutés uniquement via le CCR5 dans une moindre proportion.

L'impact sur l'athérosclérose n'est pas totalement élucidé. En effet, de nombreuses études sur des modèles invalidant les gènes codant pour ces différents récepteurs montrent un rôle pro ou

anti athérogène. L'absence du CCR2 est liée à une diminution de la formation de lésions d'athérome révélant un rôle pro-athérogène dans l'initiation de la maladie ^{155 156}. De même, un rôle de promotion de l'athérosclérose est décrit pour le CX3CR1, récepteur de la fractalkine. En effet, lorsque ce récepteur est absent les souris développent moins d'athérosclérose ^{157 158}. Enfin, le rôle du CCR5 est encore controversé, on peut cependant remarquer qu'il est décrit comme pro-athérogène contrairement au CCR1 autre récepteur pour RANTES ¹⁵⁹. De plus une étude sur un modèle multi déficient pour CCL2, CX3CR1 et CCR5 montre une diminution de l'athérosclérose avec une diminution de la monocytose Gr1^{hi} et ^{low} ¹⁶⁰. Il est donc compliqué aujourd'hui d'affirmer un rôle protecteur ou délétère pour chacune des sous populations monocytaires la tendance actuelle révélant un possible recrutement temporel différent entre les monocytes Gr1^{hi} et les monocytes Gr1^{low} ^{149 161 162}.

Un moyen pour mieux comprendre l'implication que ces cellules peuvent avoir est d'étudier les types cellulaires auxquels ils peuvent donner naissance lors de l'infiltration tissulaire. Il est montré que les monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques ou bien en macrophages suivant leurs phénotypes mais aussi suivant l'environnement dans lequel ils se trouvent (Figure 10).

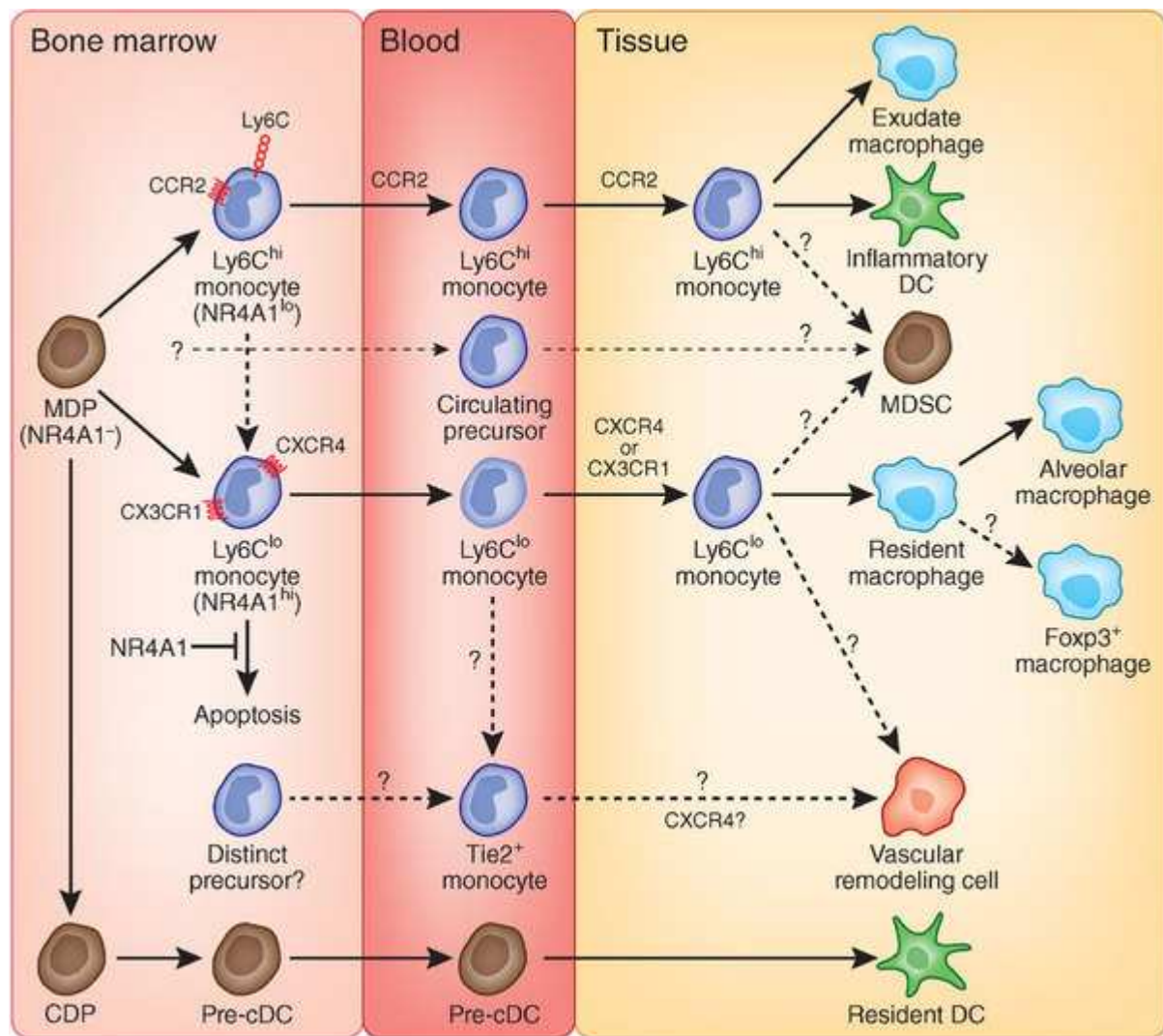


Figure 10 : les différentes sous population monocytaire chez la souris et leurs dérivés potentiels ¹⁶³

2. Les cellules dendritiques, interface entre l'immunité innée et adaptative.

Les cellules dendritiques sont des cellules cruciales dans l'immunité puisqu'elles ont la capacité de capter des antigènes, de les « processor » et de les présenter associés à des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité pour que les réponses immunitaires adaptatives puissent se développer. Comme mentionné plus haut sur le rôle de l'immunité

spécifique dans l'athérosclérose, les lymphocytes T et B semblent impliqués dans la pathologie. Il paraît donc logique d'imaginer que les cellules dendritiques, qui représentent les principales cellules présentatrices d'antigènes, soient elles aussi mises en jeu dans les maladies inflammatoires chroniques. La difficulté réside dans le fait que ce type cellulaire est très important dans sa fonction mais peu représenté dans la circulation. Malgré cela, il est rapporté que les cellules dendritiques sont présentes dans l'intima artérielle d'individus humain sains ¹⁶⁴, mais aussi dans les lésions expérimentales chez la souris via l'implication de médiateurs d'adhésions et de recrutements que son VCAM-1 et CX3CR1 ¹⁶⁵. De plus, au cours de l'aggravation de la maladie chez l'homme, la présence des CDs dans l'infiltrat lésionnel est augmentée, colocalisant avec les cellules T. Ceci suggère la présence d'un phénomène de présentation et d'activation entre CDs et LT dans la plaque (Figure 11) ^{166 167}.

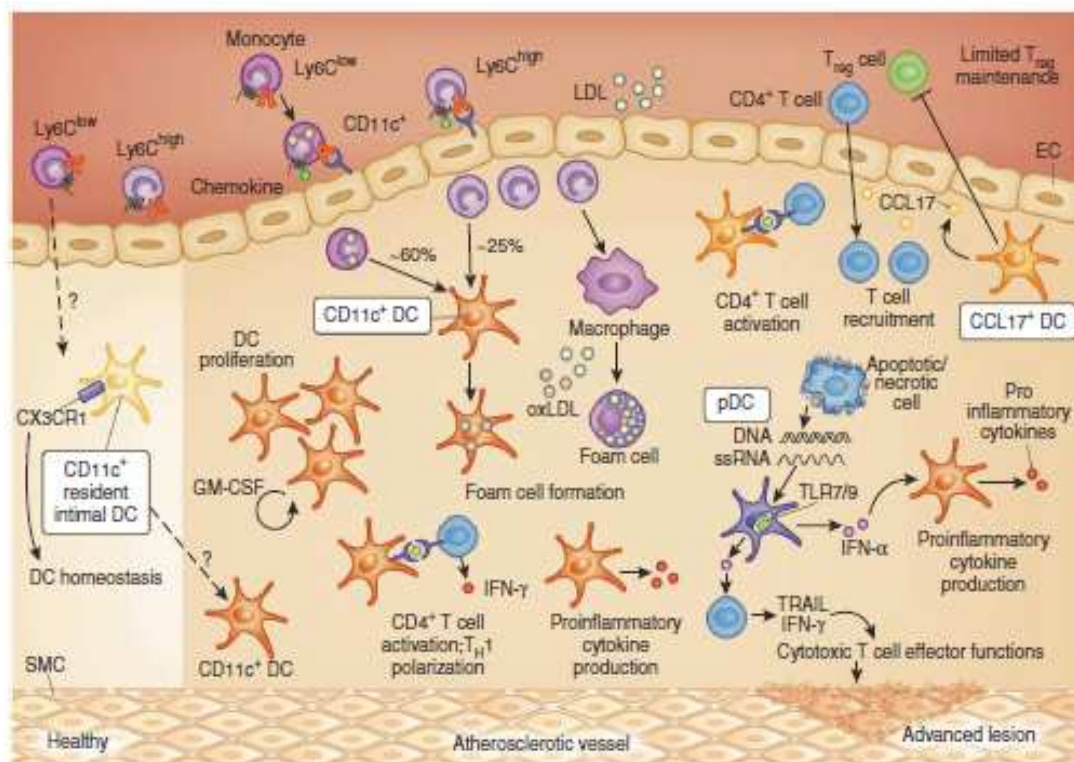


Figure 11 : les CDs dans l'athérosclérose, croisement entre immunité innée et adaptative ¹⁶⁸

Il est montré dans le cadre de l'athérosclérose que les lymphocytes T activés produisent le MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) qui permet le recrutement des monocytes sur le site inflammatoire ¹⁶⁹. Cependant, les monocytes possèdent peu de CMH II, la molécule qui permet la présentation antigénique aux Th, le lien entre monocytes et activation T est donc difficile à établir. La solution vient du fait que les monocytes sont capables de se différencier en CD^s ^{170 171} qui ont la capacité de stimuler les Th dans l'inflammation vasculaire ¹⁷². Sur la base de l'expression du CD11c, du CMH II, du CD11b et du CD68, des études différencient la présence des CD et des macrophages dans l'aorte murine ¹⁷³, et plus précisément dans les régions proathérogènes ¹⁷⁴. Il semble aussi que ces cellules soient capables d'accumuler des lipides et de devenir des cellules spumeuses ¹⁷⁵. Ceci sous-entend qu'elles sont donc proathérogènes et issues des monocytes ¹⁶⁵. Or, l'injection de CD chargées avec des LDLox entraîne une protection contre la maladie ¹⁷⁶, et l'élévation du niveau des LDLox entraîne une apoptose pathologique augmentée des CD ¹⁷⁷. Ces données sont en accord avec des travaux auxquels j'ai participé au début de ma thèse qui montrent que la diminution de la sensibilité à l'apoptose des CD dans un modèle hypercholestérolémique murin Apoe^{KO} est associée à une diminution du niveau plasmatique de cholestérol. Ce phénomène est associé à un léger effet athéroprotecteur masqué par une inflammation Th1/Th17 augmentée (annexe 2). Les données sur les cellules dendritiques et leur rôle protecteur ou pathologique dans les maladies inflammatoires chroniques comme l'athérosclérose sont donc discutées puisque d'une part on les décrit comme promoteur de l'inflammation Th1 et d'autre part on remarque qu'elles peuvent diminuer l'athérosclérose suivant leur environnement.

Les avancées technologiques des dernières années nous permettent d'obtenir de nouvelles pistes puisqu'il est décrit maintenant que les cellules dendritiques représentent une population hétérogène avec des propriétés différentes. Les sous-populations sont différenciées par l'expression de molécules comme CD11c, CD11b, CD8 α , mPDCA-1, B220 etc. On y trouve

les CD conventionnelles présentent dans les tissus périphériques, les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions, mais aussi dans le sang. Dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires on trouve aussi présence des CD plasmacytoïdes alors que dans la peau on ne décrit actuellement que 2 populations de CD myéloïdes localisées dans l'épiderme (cellules de Langerhans) et dans le derme (cellules interstitielles). Au niveau de l'aorte, il est distingué 2 voies majeures de production des CD. L'une nécessitant l'interaction du ligand Flt3 avec son récepteur, cette voie est semble-t-il indépendante des monocytes et le phénotypage des cellules dendritiques associées montre une expression CD11c^{hi}, CD11b^{neg}, F4/80^{neg}, CD103⁺ (ligand de l'E-cadherin). L'autre voie est indépendante du Flt3 et les cellules qui en sont issues viennent d'une différenciation monocyttaire. Elles sont décrites comme CD11c^{hi}, CD11b⁺, F4/80⁺, CD103^{neg}, CD14⁺, DC-SIGN⁺, CX3CR1⁺ ^{178 179}, ^{180 181 182 183}. L'origine monocyttaire a été confirmée grâce à l'analyse des CD aortiques de souris op/op déficientes pour le M-CSF qui ne présentent pas de CD CD11c^{hi}, CD11b⁺. Au cours de l'athérosclérose, il est rapporté une augmentation des cellules CD11c^{hi} CMH II^{hi}. L'analyse phénotypique complète montre que les cellules les plus augmentées sont celles issues de la différenciation monocyttaire. Dans des souris déficientes pour le Flt3 (Flt3^{neg/neg}), cette population d'origine monocyttaire de CD est présente alors que la population CD11c^{hi} CD11b^{neg} est absente. De façon surprenante, ces souris ont une sensibilité à la maladie augmentée signant donc des effets opposés des CD selon le type augmenté. En effet, on peut supposer de ces travaux que les CD d'origine monocyttaire sont pro-athérogènes puisque leur taux est augmenté dans les aortes de souris athéroscléreuses alors que les CD Flt3 dépendantes semblent elles protectrices puisque la taille des lésions chez les souris est augmentée en leur absence ¹⁸³. Le mécanisme impliqué dans l'ensemble de ces processus protecteurs et/ou pathologiques n'est pas encore élucidé. Néanmoins, quelques possibilités apparaissent au regard des fonctions des CD. En effet, les CD immatures sont capables de

reconnaître et de capter des antigènes dits du « soi » et d'induire une tolérance en périphérie pour permettre un renouvellement cellulaire normal sans induire de réponse immunitaire ¹⁸⁴.

Dans le cadre d'une inflammation non résolutive, les CD peuvent reconnaître ces mêmes antigènes non pas comme des molécules du « soi » mais comme des signaux de souffrance cellulaire on appelle alors ces antigènes des DAMPs pour « damage associated molecular patterns » en analogie avec les PAMPs cité précédemment. Ces DAMPs sont issus de la mort cellulaire apoptotique, nécrotique ou nécrotique post apoptotique ^{185 186}. La reconnaissance de ces DAMPs entraîne alors une réponse immunitaire anormale de type auto-immune ¹⁸⁷. Ainsi, on suppose que la survie des CD est vraisemblablement protectrice (annexe 2).

Hormis les CD conventionnelles, on retrouve dans la circulation les CD plasmacytoïdes (pDCs). Ces cellules chez l'homme sont définies par une faible expression du CD11c, une expression du marqueur BDCA-2 (CD303) et du CD123. Chez la souris, on les trouve comme CD11c^{low} et mPDCA-1⁺. Elles représentent entre 0.1 et 0.5% des leucocytes du sang et des organes lymphoïdes secondaires. Leur fonction la plus connue aujourd'hui est de répondre via l'inflammation aux infections virales et bactériennes malgré le fait qu'elles soient faible stimulateur T puisque exprimant faiblement le CMH II. Le mécanisme d'action décrit dans ces réponses engage notamment le TLR7 et le TLR9 qui reconnaissent les acides nucléiques. Lors de cette stimulation, les pDCs produisent des interférons de type I (IFN α , IFN β , IFN ω , IFN λ). Or l'IFN α est plutôt connu comme pro-inflammatoire et donc pro-athérogène ^{188 189} alors que l'IFN β est encore très peu étudié du fait d'une quantification difficile. Néanmoins, il semble plus anti-inflammatoire en favorisant la réponse IL-10 et Treg qui confère donc un rôle tolérogène aux pDCs ^{190 191}.

Dans le processus athéroscléreux, le rôle des pDCs n'est pas encore totalement établi. Dans un premier temps, ces cellules étant peu représentées dans les plaques humaines et inexistantes dans les plaques expérimentales murines, leur rôle dans la pathologie a été

négligé. Aujourd'hui elles sont clairement décrites comme présentes au niveau de l'épaule des plaques c'est-à-dire en périphérie du cœur nécrotique ¹⁸⁸ {bobryshev 1995} ¹⁹². La littérature commence à se développer autour du rôle de ces cellules dans ce processus pathologique. Très récemment, une équipe leur attribue un rôle protecteur. Les auteurs ont d'abord quantifié la présence des pDCs via le BDCA-4 et n'observe pas de variation au cours de la progression de la maladie. Afin de mieux étudier le rôle de ces cellules dans l'athérosclérose, ils ont choisi de travailler sur un modèle murin d'athérosclérose dans lequel ils déplètent ce type cellulaire grâce à un anticorps reconnaissant PDCA-1 (le 120G8). La suppression cellulaire est effective puisque les souris perdent leur capacité de production de l'IFN α via les pDCs. L'analyse de cette absence pendant la phase d'initiation de la maladie mais aussi durant la phase de progression révèle une augmentation de la taille des plaques d'athérome ainsi qu'une instabilité de celles-ci qui présentent un cœur nécrotique plus grand. Aucune différence de poids ni de cholestérol plasmatique n'est détectée, ce qui suggère un mécanisme impliquant l'immunité et non le métabolisme lipidique. En effet, le cholestérol peut être modulé par les CD comme nous le montrons dans le laboratoire avec un modèle de survie des CD diminuant les taux de cholestérol plasmatique (annexe 2) L'absence des pDCs au sein des lésions murines sous-entend que l'effet protecteur de ce type cellulaire se déroule en périphérie et non directement dans la paroi vasculaire. Les auteurs ont alors quantifié les différentes sous populations de lymphocytes T dans les plaques, le sang et la rate des souris ainsi que les médiateurs possiblement impliqués dans l'inflammation. Ils notent une augmentation de l'infiltrat T dans les plaques et un niveau circulant et splénique de ces cellules plus élevé lorsque les pDCs sont éliminées. Dans le même temps, les dosages de cytokines montrent une augmentation de l'inflammation avec l'IL-6, l'IFN γ et le MCP-1 qui augmentent alors que l'IL-10 et les Treg ne varient pas. Les analyses génétiques et moléculaires de l'infiltrat T des plaques indiquent une polarisation Th1 au détriment des Th2

lorsque les pDCs sont absentes puisque le facteur t-bet n'est pas modifié (pro Th1) alors que GATA-3 est diminué en absence des cellules (pro Th2). Ainsi, l'hypothèse des auteurs d'une protection de l'athérosclérose par les pDCs réside dans leur capacité à promouvoir la tolérance et inhiber l'inflammation Th1 ¹⁹³.

La conclusion par rapport à l'ensemble de ces données bibliographique est que la fonction de cellule présentatrice d'antigène ne prédomine pas forcément sur le rôle des CD dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose. L'environnement et surtout l'importante diversité des sous populations qui composent ce groupe de cellules représentent des enjeux majeurs dans la compréhension des mécanismes des maladies inflammatoires.

3. Les macrophages, phagocytes majeurs impliqués dans l'athérosclérose.

Le macrophage est la cellule clé à l'origine du développement des plaques d'athérome et il joue un rôle à tous les stades de la pathologie. En effet, par son implication dans le métabolisme des lipoprotéines, son aptitude à capter le cholestérol, à produire des cytokines inflammatoires et son implication dans l'efferocytose des cellules apoptotiques, le macrophage influence la progression des plaques d'athérome (Figure 12) ^{194 78}.

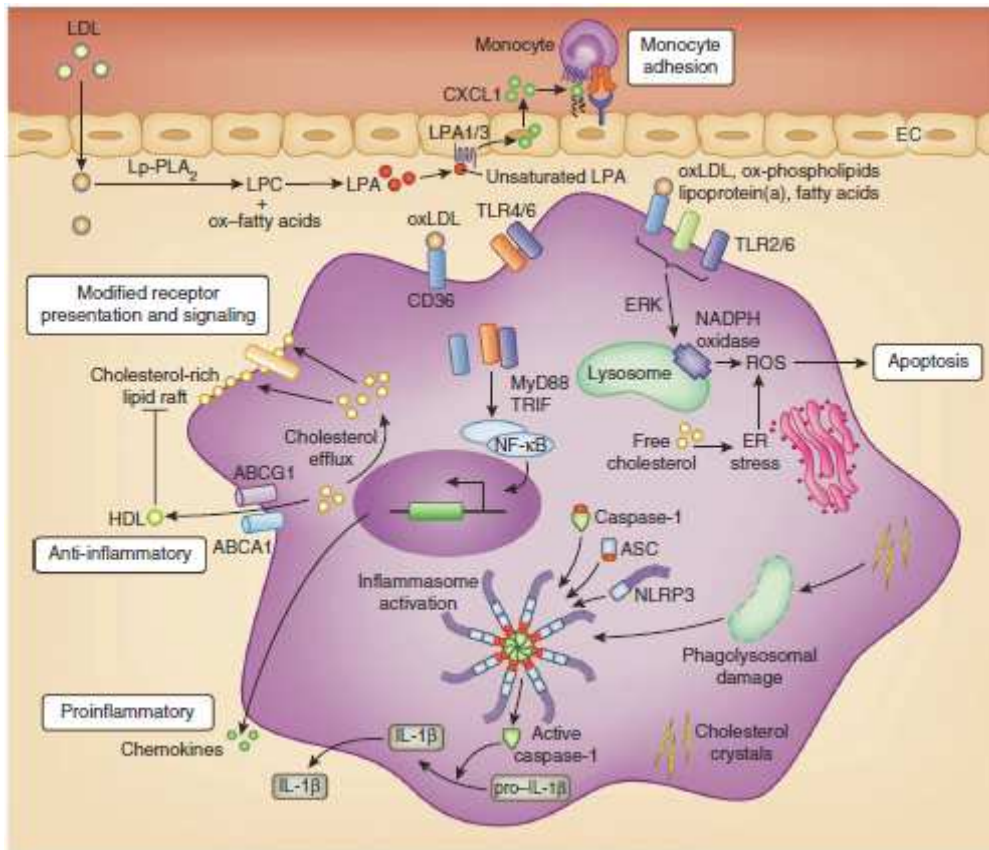


Figure 12 : effet des lipides sur le macrophage et l'inflammation au cours de l'athérogénèse

168

Dans la 1^{ère} partie de cette introduction traitant de l'apoptose, j'ai déjà décrit l'importance dans l'athérosclérose de la mort cellulaire du macrophage ainsi que la nécessité d'une clairance efficace via ce type cellulaire. Toutefois, de nombreux travaux ont étudié l'inflammation et les voies d'activations de cette cellule dans la pathologie. Il semble aujourd'hui accepté que les PRR, représentés par les TLR (Toll-like receptor) et les NLR (NOD-like receptor) et les récepteurs lectines de type C, ont un rôle clé dans la reconnaissance des DAMPs et autres produits issus de l'apoptose/nécrose des cellules. Parmi les ligands de ces récepteurs, on retrouve les épitopes oxydés issus des lipides, des protéines ou de l'ADN¹⁹⁵, les produits issus de la nécrose cellulaire¹⁹⁶ et l'ApoC III¹⁹⁷. Les lipides ont bien évidemment représenté un intérêt majeur dans ce domaine d'exploration, et il est montré

que les phospholipides oxydés sont reconnus par les macrophages grâce aux récepteurs CD36 et TLR2 et qu'ils en augmentent l'apoptose ¹⁹⁸. De même, les LDL qui ont un rôle pro-athérogène de part leur rôle dans le métabolisme lipidique comme mentionné au début de cette introduction, sont aussi reconnues par les macrophages. Lorsque que celles-ci sont faiblement modifiées, elles semblent être les ligands du TLR4 associé au récepteur CD14 et MD2. L'interaction de ces molécules aboutit à une inflammation caractéristique de l'athérosclérose ⁶³. De façon identique, l'inflammation peut aussi être issue de la reconnaissance des LDLox sauf qu'il semble que l'interaction n'implique dans ce cas non pas le CD14 mais le CD36, récepteur éboueur impliqué aussi dans l'athérosclérose ¹⁹⁹. Le macrophage, grâce à l'importante diversité des PRR qu'il possède, reconnaît donc de nombreux éléments produits lors de l'athérosclérose et plus généralement lors de pathologies inflammatoires et de souffrance tissulaire ^{200 201 202 203 204}. L'analyse en aval de ces reconnaissances ligands-récepteurs révèle l'existence de 2 voies de signalisations distinctes, la voie NFκB et la voie IRF (interferon response factor). La voie IRF aboutit à la synthèse des interférons de type I dont on a vu le rôle dans la partie précédente traitant des pDC. La voie NFκB fait intervenir de nombreux acteurs moléculaires dont certains sont impliqués dans l'athérosclérose comme MyD88, les TLR et la famille des récepteurs de l'IL-1 (IL-1 et IL-18) ^{205 206}. Elle aboutit à la production et sécrétion de médiateurs et cytokines inflammatoires telles que l'IL-12. D'autres types de récepteurs pourraient être impliqués dans l'athérosclérose ayant un lien avec la voie NFκB, les récepteurs lectines de type C ainsi que les NLR. Pour les récepteurs lectines on peut citer LOX-1 « lectin type oxydized LDL receptor 1 » qui possède la faculté de reconnaître les LDLox ou bien les cellules apoptotiques. Ces reconnaissances aboutissent là aussi à l'activation de la voie NFκB pro-inflammatoire ^{207 208}. Concernant les NLR, ceux-ci sont intracellulaires, et font parti d'une structure que l'on appelle l'inflammasome. Or il semble que cette structure, lors d'une stimulation via les TLRs et les

NLR, soit capable d'activer un ensemble de processus et de protéines telles que les caspases. Ce processus aboutit de plus à la libération de cytokines pro-inflammatoires et peut être un lien entre l'apoptose, l'inflammation et l'immunité au cours de processus pathologique inflammatoires chroniques. En effet, dans le cadre de l'athérosclérose, on observe une augmentation du récepteur NOD2 dans les macrophages lésionnels aboutissant à une activation NFκB²⁰⁹. De plus, la présence de cristaux de cholestérol dans les plaques avancées mais aussi dès les phases précoces de la pathologie, est capable d'activer l'inflammasome NLRP3²¹⁰. Or le croisement de souris athérosensibles avec des souris déficientes pour les acteurs impliqués dans cette voie (NLRP3^{KO} ou IL-1^{KO}) présentent une diminution de l'athérosclérose et une diminution de la production de la cytokine pro-inflammatoire pro athérogène IL-18²¹¹. Confirmant l'ensemble de ces données sur un rôle pro-athérogène de la voie NFκB, une étude récente montre que, lorsque ce médiateur est activé en présence de cytokines pro-inflammatoires, l'inflammasome NLRP3 est activé²¹². Cependant une étude sur la délétion dans le macrophage murin d'un activateur de NFκB (IKK2) montre qu'en l'absence d'une activation de cette voie, les lésions expérimentales d'athérosclérose sont augmentées. Cette étude signant alors un effet protecteur de cette voie de signalisation²¹³.

Pour mieux comprendre le rôle dans le macrophage de ces divers médiateurs, un point crucial reste à définir. En effet, de même qu'il est rapporté une dichotomie Th1/Th2, plusieurs groupes ont défini une hétérogénéité dans la population générale des macrophages avec une dénomination M1/M2 suivant si ceux-ci sont différenciés à partir de cytokines Th1 ou bien Th2. On parle aussi pour les macrophages M1 de macrophages activés de manière classique alors que pour les M2 on parle d'une activation alternative²¹⁴ (Figure 13).

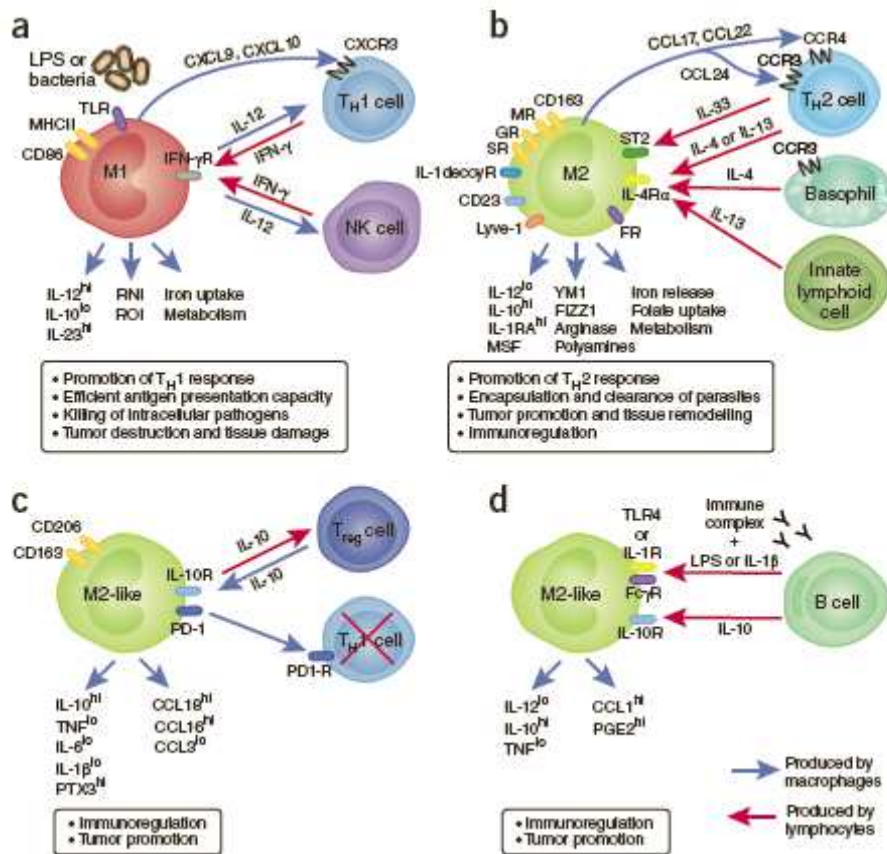


Figure 13 : Polarisation et activation des macrophages en fonction de l'environnement. (a) polarisation M1 et interaction avec les Th1 et cellules NK. (b) polarisation M2 sous l'action de cytokines « Th2 ». (c) polarisation M2 par interactions avec les Treg. (d) polarisation M2 par interaction avec les LB ²¹⁵

Ainsi, *in vitro*, la différenciation de monocytes en macrophages en présence soit de GM-CSF soit de M-CSF induit une polarisation M1 (responsable de la destruction tissulaire) ou M2 (responsable de la réduction de l'inflammation et de la réparation tissulaire) respectivement avec la capacité de sécréter soit des médiateurs inflammatoires (IL-6, TNFα) soit pro Th2 (IL-4, IL-13) ²¹⁶. Cependant, de nombreux groupes englobent dans leur dénomination M1/M2 des macrophages qui ne sont pas issus d'une différenciation par les cytokines Th1/Th2, mais qui possèdent des propriétés pro ou anti-inflammatoires. Ainsi, on peut classer ces

macrophages suivant qu'ils favorisent la balance IL-12/IL-10 d'un coté ou de l'autre ²¹⁷. En effet, la différenciation des macrophages montre qu'au sein même de la population dite M2, on peut retrouver des macrophages qui présentent cette forme alternative d'activation Th2 mais aussi des macrophages que l'on appelle en réalité régulateurs pour leur capacité à produire du TGFβ et de l'IL-10 ²¹⁸.

Au sein des plaques, on retrouve la présence de ces différents types de macrophages. Les M1 comme précédemment mentionnés, qui se différencient en présence de l'IFNγ, et ont un rôle plutôt pro-athérogène puisque des souris déficientes en IFNγ présentent une diminution des lésions avec un infiltrat Th1 et macrophagique plus faible ^{219 220 91}. De plus, ils sont activés en présence du TNFα et d'IFNγ, la voie NFκB est alors impliquée via les TLR et lorsque leur développement n'est pas contrôlé cela aboutit à des dommages tissulaires ^{221 222 223}. A l'inverse, lorsque les plaques possèdent des macrophages de type M2 en présence de l'IL-4, il semble qu'il y a réduction de l'inflammation. La confirmation par l'approche inverse montre lorsque ce type de macrophages est absent, les plaques d'athérome croissent ^{216 224 145 225}. D'autres groupes rapportent la possibilité qu'un type soit associé à la stabilité de la plaque (M2) alors que l'autre (M1) peut à l'inverse corrélérer avec le développement du cœur lipidique et l'instabilité des lésions. Néanmoins, un autre type de cellules macrophagiques est décrit, le macrophage régulateur (Mreg) qui aurait des propriétés anti-inflammatoires en diminuant l'IL-12 et donc augmentant le ratio IL-10/IL12 ^{226 227}. Ce type Mreg, semble différent des macrophages M2. En effet, les M2 qui sont impliqués non pas dans la réduction de l'inflammation comme initialement décrit mais plutôt dans la réparation tissulaire en favorisant la production de composants de la matrice extracellulaire n'auraient pas la possibilité comme les Mreg de produire le TGFβ et l'IL-10 ^{221 228}. La difficulté actuelle réside donc dans le fait qu'aucun marqueur spécifique pour chaque sous population existe. Dès lors, l'interprétation des résultats de chaque équipe est sujette à controverse. En effet, certains

rapportent le macrophage M2 comme anti athérogène par sa capacité à produire un environnement anti inflammatoire, à avoir une meilleure efferocytose, mais aussi à favoriser l'efflux de cholestérol via l'activation PPAR et des transporteurs du cholestérol (ABCA1, ABCG1) (Figure 14 et 15)^{229 230 231 232}. D'autres groupes montrent l'inverse, avec sur des macrophages M2 caractérisés par la présence du mannose récepteur, une diminution de l'efflux associée à une diminution de l'Apoe et du transporteur ABCA1²³³.

Il apparaît donc essentiel de découvrir de nouveaux marqueurs permettant de différencier les macrophages M2 des macrophages Mreg. Enfin, il est possible qu'au cours de l'évolution de la pathologie ait lieu une plasticité entre ces types de macrophages^{224 234 233}.

La définition et le rôle de chaque sous type de macrophage lors de l'athérosclérose restent donc encore un champ d'investigation vaste afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Ainsi, on remarque que lors de processus inflammatoires chroniques, un ensemble de facteurs semblent impliqués avec de façon commune l'activation du système immunitaire. Cette introduction bibliographique ne fait état que des connaissances actuelles sur l'athérosclérose comme maladie immuno-inflammatoire, néanmoins, il est intéressant de voir que dans ce type de processus complexe, divers acteurs sont impliqués allant du métabolisme lipidique à l'immunité, les phagocytes mononucléés pouvant représenter le lien entre tous ces systèmes.

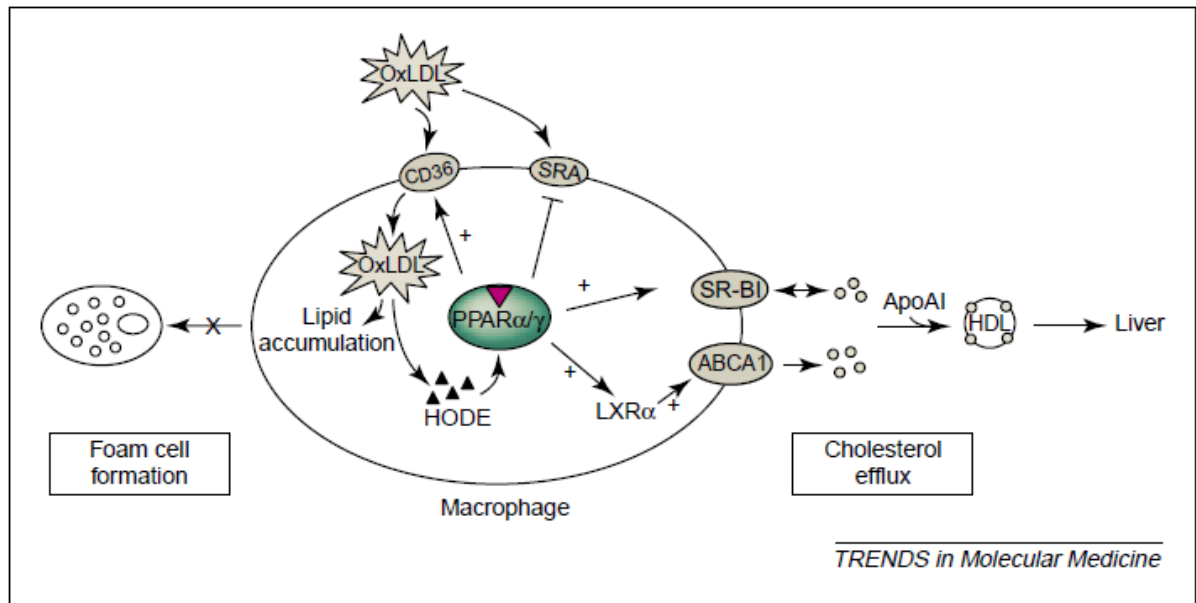


Figure 14 : augmentation de l'efflux du macrophage après activation de PPAR²³⁵

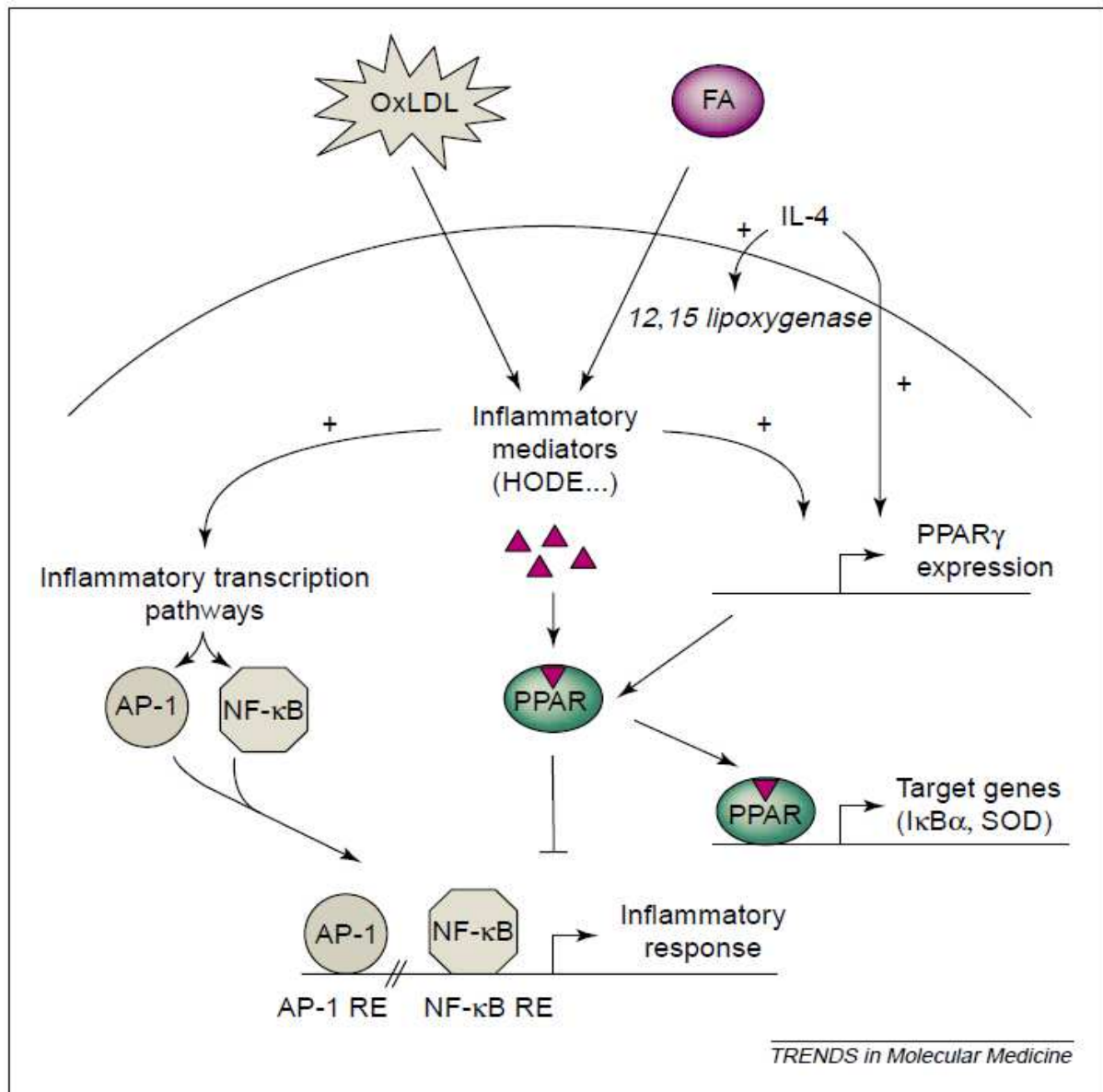


Figure 15 : inhibition de l'inflammation induite par NF κ B lors de l'activation PPAR²³⁵

III. Objectifs

Le projet initial présenté en 2008 concernait l'étude de l'implication des cellules dendritiques dans le développement de l'athérosclérose. Des travaux auxquels j'ai participé au début de cette thèse montraient que la survie des CD_s était associée à une diminution des niveaux plasmatiques de cholestérol (annexe 2). L'effet protecteur sur les lésions était faible car les animaux développaient dans le même temps une réponse inflammatoire Th1/Th17 plus importante. L'objectif de mes travaux de thèse était donc de croiser ces souris CD11c-hBcl2 avec des souris immuno-déficientes Rag2^{KO} sous fond hypercholestérolémique Apoe^{KO} afin de tester la dépendance ou l'indépendance des effets hypocholestérolémians des CD_s vis à vis de la réponse immune *per se*. Cette stratégie aurait permis de discriminer entre un rôle direct des CD_s sur le métabolisme du cholestérol, ou bien si cet effet passait par un autre type de cellules immunitaires. Malheureusement, les difficultés inhérentes au croisement et au maintien de souris immuno-déficientes multitransgéniques et plus particulièrement la faible productivité des souris Apoe^{KO}-Rag2^{KO} ne m'ont à l'heure actuelle pas permis de mener à bien ce projet. En parallèle de ces études, j'ai initié d'autres projets visant à mieux comprendre le rôle des monocytes et macrophages dans l'athérosclérose. Ainsi, alors que le laboratoire avait précédemment rapporté un rôle de la survie des macrophages dans l'amélioration de l'athérosclérose, j'ai souhaité étudier l'effet inverse en utilisant des souris CD11b-DTR dans lesquelles l'injection de toxine diphtérique (DT) est décrite comme capable d'induire la déplétion des monocytes et des macrophages ²³⁶. Basé sur l'expérience du laboratoire, en utilisant les souris CD11c-DTR, nous avons utilisé ces souris transgéniques en fond génétique hétérozygote (CD11b^{DTR/+}) afin de pouvoir comparer les souris transgéniques et les souris sauvages d'une même portée. Après de multiples expériences dans lesquelles j'ai varié les doses et les cinétiques d'injection de DT, nous n'avons jamais observé de déplétion

ni dans les monocytes, ni dans les neutrophiles ni dans les macrophages sur la base de plusieurs marqueurs différents (CD11b, CD11c, F4/80, Ly6C, Gr1, CD115, CD66b, CMH II) et quel que soit les organes (rate, sang, exsudats péritonéaux). Après une analyse exhaustive de l'ensemble de la littérature utilisant ces souris, aucun article ne rapportait l'utilisation des souris en mode bi-allélique (CD11b^{DTR/DTR}) pour une déplétion efficace de ces types cellulaires hormis un article récent ²³⁷. Aujourd'hui, au sein du laboratoire ces souris sont en croisement afin d'obtenir cette homozygotie. Finalement, le projet dont le 1^{er} article fait l'objet a été initié à la fin de l'année 2010, l'objectif était d'évaluer sur des plaques d'athérome préexistantes l'impact athéroprotecteur voir régressif d'une transplantation de macrophages ayant une demi-vie augmentée par l'expression de la protéine anti-apoptotique humaine Bcl2 sous contrôle du promoteur CD68 spécifique des macrophages : modèle CD68-hBcl2 (Mø-hBcl2). Ainsi, nous avons déterminé les mécanismes associés à la diminution des lésions dans le modèle de régression CD68-hBcl2 dans 2 fonds génétiques hypercholestérolémiques différents qui présentent soit une déficience pour le récepteur aux LDL soit une déficience pour l'apolipoprotéine E. Mon projet de thèse initial sur des modèles murins était couplé à une étude clinique visant à évaluer la relation entre la lipidémie et les CD au sein d'une cohorte de patients dyslipidémiques traités ou non avec les hypocholestérolémiants actuels (statines). Cependant, la mise en place et le recrutement des patients a été retardé et ce projet n'en est qu'à la moitié de son terme et ne sera donc pas exposé dans ce mémoire de thèse. En revanche, en collaborant avec des cliniciens de l'hôpital Saint Louis j'ai été impliqué dans l'étude d'une maladie inflammatoire chronique impliquant des altérations du métabolisme lipidique : le xanthogranulome. Cette étude fait l'objet du deuxième article que je présente dans ce mémoire de thèse.

Ainsi, les objectifs de mes travaux étaient :

- ✓ De caractériser les modèles hypercholestérolémiques LDLr^{KO} et Apoe^{KO} qui expriment la protéine hBcl2 sous contrôle du promoteur CD68 des macrophages.
- ✓ D'identifier les mécanismes impliqués dans la diminution des plaques lorsque la demi-vie des macrophages est augmentée. Analyses réalisées dans 2 fonds génétiques athérosensibles différents LDLr^{KO} et Apoe^{KO}.
- ✓ D'évaluer si survie des macrophages est capable de stabiliser voir de faire régresser les plaques d'athérome. En effet, le rôle protecteur sur les phases tardives précédemment décrit dans le laboratoire n'évalue pas l'impact de la diminution de l'apoptose du macrophage dans des lésions préétablies.
- ✓ D'étudier dans une pathologie lipido-inflammatoire humaine les modifications du système immunitaire et plus précisément des phagocytes mononucléés en relation avec le métabolisme des lipides.

IV. Exposé des travaux de thèse

1. Article 1: Increasing survival of macrophages exerts protective functions on progression of established atherosclerotic lesions, through decreasing plasma cholesterol levels, and dampening inflammation.

L'importance des phagocytes mononucléés, et notamment des macrophages, dans le processus pathologique de l'athérosclérose est aujourd'hui bien décrite. Ce type cellulaire est à l'origine de la formation des cellules spumeuses présentes au sein de la plaque d'athérome, est impliqué dans l'inflammation et la mort cellulaire qui sont des éléments caractéristiques de l'instabilité de la plaque.

Basé sur des résultats antérieurs montrant que la protection des macrophages face à l'apoptose entraînait une augmentation de l'aire lésionnelle dans les phases précoces de l'athérosclérose, et inversement une réduction des lésions dans les phases tardives, nous avons souhaité explorer le potentiel thérapeutique d'une telle manipulation de la demi-vie des macrophages.

Ainsi, des souris génétiquement modifiées pour être hypercholestérolémique (ApoE^{KO} ou LDLr^{KO}) ont été soumises au développement de plaques d'athérome avant irradiation et retransplantation de moelle osseuse issue de souris donneuse contrôles (ApoE^{KO} ou C57BL/6 respectivement) ou ayant une protection des macrophages contre l'apoptose (CD68-hBcl2/ApoE^{KO} ou CD68-hBcl2/ C57BL/6 respectivement).

Nos résultats montrent que la survie des macrophages permet une réduction du développement des lésions. Ce phénomène est associé à une augmentation des macrophages, des monocytes Gr1^{low}, des pDCs, des Treg et dans le modèle sous fond hypercholestérolémique ApoE^{KO} nous trouvons aussi une augmentation des LB1. Parallèlement, on note une diminution du nombre des Th et une diminution des molécules de l'inflammasome dans le fond LDLr^{KO}.

Ainsi, avec ces travaux nous montrons que moduler la demi-vie des macrophages peut en modifier leur phénotype. Ceci aboutit à des changements au niveau des réponses immunitaires et inflammatoires qui aboutissent à une réduction de la pathologie chez l'animal. Ainsi, moduler par des traitements les acteurs et les fonctions décrites dans cet article permettrait de cibler de nouveaux traitements qui associés aux hypocholestérolémiants actuels pourraient réduire le risque résiduel d'accidents cardiovasculaires.

Increasing survival of macrophages exerts protective functions on progression of established atherosclerotic lesions, through decreasing plasma cholesterol levels, and dampening inflammation.

John Pirault^{1,2}, Laura Bouchareychas^{1,2}, Flora Saint-Charles^{1,2}, Emmanuel Gautier^{1,2}, Philippe Giral^{1,3,4}, Thierry Huby^{1,2,3,4} and Philippe Lesnik^{1,2,3,4}

¹ INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR-S 939, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme, F-75013, Paris, France

⁴ The ICAN Institute of CardioMetabolism and Nutrition F-75013, Paris, France

ABSTRACT

Background: Specific protection of macrophages against apoptosis has a protective effect on advanced atherosclerotic lesions development. This result suggests that increasing survival of macrophages may have therapeutic values on the progression of established atherosclerotic lesions. However, the mechanisms whereby macrophage afford protection needs to be further defined.

Methods and Results: We used a transgenic mouse model in which the lifespan of Macrophages are enhanced by specific overexpression of the antiapoptotic gene hBcl-2 under the control of the CD68 promoter (Mø-hBcl2). To investigate macrophage-dependent atheroprotective mechanisms, we allowed plaques to develop in Apoe KO or LDLr KO mice, and then irradiated them before bone marrow transplantation using control or Mø-hBcl2 donors. In mice transplanted with Mø-hBcl2 bone marrow cells, progression of advanced lesions were diminished, plasma cholesterol levels were reduced, whereas tissue macrophages, circulating Gr1^{low} monocytes and plasmacytoid dendritic cells populations were increased. In both LDLr KO and Apoe KO mice, a reduction in T-helper cells and an increase in regulatory T-cell population were observed in the presence of the transgene. In addition, other anti-atherogenic mechanisms were more specifically observed in the LDLr deficient background (decreased plasma levels of IL-18 and IL-12) and in the Apoe deficient background (increase number of B1 cells).

Conclusions: collectively, these data suggest that Bcl-2-mediated survival of macrophage modulates the atherosclerotic process through multiple pathways which directly or indirectly impact both immuno-inflammatory responses and cholesterol homeostasis.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is the leading underlying cause of death worldwide. Absolute risk for cardiovascular diseases rises with age, because of the progression of coronary atherosclerosis. To date, the major intervention to delay or halt disease progression has been the use of statins to lower LDL. Nevertheless, these drugs were proven to have modest effect on plaque burden and risk by the REVERSAL and ASTEROID studies ^{1 2}, which showed small degree of regression, and large scale clinical trials, which still register substantial rates of heart attacks during treatment. Thus, by understanding the factors that lead to plaque regression, better treatment options beyond current therapies may be developed for many at risk, who already carry a heavy plaque burden.

Atherosclerosis results from both, disrupted lipid homeostasis ³, and chronic inflammation, which involves a number of immune pathways. As cells involved in both lipid and immune processes, macrophages play a key role throughout atherogenesis, from initiation and fatty streak formation, to plaque rupture ^{4 5}. Macrophage apoptosis has been identified as a prominent feature of atherosclerotic plaques, this because macrophage cell death is believed to support necrotic core growth ^{6 7 8 9}. The apoptotic process is controlled by intracellular levels of proapoptotic and antiapoptotic proteins such as those of the Bcl-2 family. Indeed, the relative expression of proapoptotic (eg, Bax and Bak) and antiapoptotic proteins (eg, Bcl-2 and Bcl-xL) of the Bcl-2 family determines the overall sensitivity of the cell to apoptotic stimuli ¹⁰. In macrophages of atherosclerotic lesions, the proapoptotic Bax and Bak proteins predominate, whereas the antiapoptotic Bcl-2 and Bcl-xL are deficient, thereby arguing for their enhanced susceptibility to apoptosis ^{11 12 13}. To understand the impact of macrophage apoptosis on atherosclerosis at both early and advanced stages of lesion progression, we previously used a transgenic approach, allowing specific protection of macrophages against apoptosis (M ϕ -hBcl2 mice). With this approach, we demonstrated that macrophage apoptosis was antiatherogenic during the early stages of atherosclerosis, whereas macrophage cell death accelerated plaque progression in more advanced lesions ¹⁴.

In addition to dissecting the role of macrophages in the progression of atherosclerosis, there is a growing interest in the mechanisms leading to the stabilization or regression (reduced volume) of

established atherosclerotic lesions. Blocking the progression of atherosclerotic lesions and inducing their regression are highly desirable goals. Although mouse models have provided valuable information about atherosclerosis progression, little is known about the molecular mechanisms underlying regression. To investigate these mechanisms, in established atherosclerotic lesions, bone marrow cells harvested from controls and Mø-hBcl2 mice were transplanted into lethally irradiated Apoe^{KO} or LDLr^{KO} mice with established lesions (25 and 14 weeks old respectively). At the age of 40 weeks for the Apoe^{KO} and the age of 34 weeks for the LDLr^{KO}, we measured lesion size in the aortic sinus, as well as immune status, inflammatory circulating cytokines and plasma cholesterol levels. We found in the two experimental models, that progressions of advanced lesions were significantly diminished in the presence of macrophages over-expressing hBcl2.

MATERIALS AND METHODS

Animals and bone marrow transplantation

The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the European Commission Directive 86/609/EEC. All animal procedures were performed at the Central Animal Facility of the Medical Faculty of La Pitie Hospital with approval from the Direction Departementale des Services Veterinaires, Paris, France. Mice were housed in a conventional animal facility, weaned at 21 days, and fed ad libitum a normal mouse chow diet (RM1, Dietex France). All animal models were on a pure C57BL/6 background. CD68-hBcl2 mice (Mø-hBcl2) were generated in our laboratory by E. Gautier ¹⁴. For bone marrow transplantation, LDLr^{KO} and Apoe^{KO} mice were subjected to medullar aplasia with 9 Gray lethal total body irradiation. The next day, femora bone marrow was isolated from donors and 6×10⁶ bone marrow cells were i.v injected into the irradiated mice to rescue their hematopoietic system. Mice were housed in cages under air-filtered conditions with antibiotics in water (penicilline 100 U/ml + streptomycine 100 µg/ml) for 5 weeks.

Experimental protocols

As shown on Supplemental figure 1, Apoe^{KO} mice were maintained on chow diet for 25 weeks. Then mice were lethally irradiated and transplanted with bone marrow progenitor cells from Mø-hBcl2/Apoe^{KO} and Apoe^{KO} mice. Then mice were fed a chow diet for the next 15 weeks and euthanized for further investigations. In another experimental group, 6 weeks old LDLr

deficient mice were fed hypercholesterolemic Western Diet (0.15% cholesterol; SAFE-Diets) for 8 weeks before irradiation. Then mice were transplanted with transgenic bone marrow from mice expressing the hBcl2 protein in CD68⁺ cells or control C57BL/6 bone marrow cells. During recovery, and ongoing atherosclerotic lesions development, mice were fed chow diet for 20 weeks before sacrifice.

Plasma lipid analyses

Plasma samples were analysed with an autoanalyzer (Konelab) using commercial reagent kits for total and free cholesterol (Roche Diagnostics and Diasys respectively).

Quantification of atherosclerotic lesions

Atherosclerotic lesions were quantified on serial cross-sections through the aortic root by oil red O staining as previously described ¹⁴, with minor modifications. Mice were sacrificed under isoflurane anesthesia and perfused with PBS. Hearts were collected and fixed (Accustain, 10% formalin solution (Sigma) supplemented with 2mM EDTA and 20 M butylated hydroxytoluene at pH 7.4) for 30 min followed by overnight incubation in phosphate- buffered 20% sucrose solution at 4 °C; hearts were subsequently embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek). Approximately 40 sections, 10-µm thick, were cut through the proximal aorta, spanning the three cusps of the aortic valves. Every 3 section was fixed and stained with oil red O (0.3% in triethylphosphate) for 30 min and then counterstained with Mayer hematoxylin for 1 min. Images were captured using a Zeiss Axiovert 135 microscope and analyzed with Adobe Photoshop 7.0 software (Adobe Systems Inc., CA) and the Image Processing Tool Kit (Reindeer Graphics, NC) plugins. The extent of atherosclerosis was measured with color thresholding to delimit areas of oil red O staining and is reported as mean lesion area of the group of the sections analyzed.

Flow cytometry

Retro-orbital blood punctures were harvested in EDTA tubes, and 100µl were labeled with specific antibodies leucocytes. For blood myeloid cell determination, the following antibodies were used: CD45 HorizonV450, Gr1 PerCP Cy5.5, CD11b APC Cy7, CD8 PE Cy7, Streptavidin PE-TexasRed (from BD Biosciences), CMH II IA/IE Alexa Fluor 700, CD115 PE, CD11c Biotin (from eBioscience) and mPDCA-1 APC (from Miltenyi Biototechnologies). For splenic myeloid cells, CD45 HorizonV450, CD86 Alexa Fluor 700, CD11b APC Cy7, CD8 PE Cy7, Streptavidin

PE-TexasRed (from BD Biosciences), CMH II IA/IE FITC, CD11c Biotin, F4/80 PE Cy5 (from eBioscience) and mPDCA-1 APC (from Miltenyi Biotechnologies). For blood and splenic T lymphocytes antibodies were CD45 HorizonV450, CD4 HorizonV500, CD3 APC Cy7, CD62L Alexa Fluor 700, CD25 PE Cy7, Streptavidin PE-TexasRed (from BD Biosciences), CD8 Biotin and CD44 PE Cy5 (from eBioscience). B cell labeling used following antibodies: CD45 HorizonV450, CD21 APC, CD11b APC Cy7, IgM PerCP Cy5.5, CD1d PE, Streptavidin PE-TexasRed (from BD Biosciences), CD19 FITC, CD5 Biotin, CD23 PE Cy7 (from eBioscience). Peritoneal cell were labeled with CD45 HorizonV450, CD21 APC, CD1dPE, IgM PerCP Cy5.5, CD11b APC Cy7, Streptavidin PE-TexasRed (from BS Biosciences), CD19 FITC, CD5 Biotin, CD23 PE Cy7, CMH II IA/IE Alexa Fluor 700, F4/80 PE Cy5 (From eBioscience). Red Blood cells were lysed by Optilyse C solution (Beckman Coulter) end Fixed in 1% formalin. Acquisitions were done with LSR II Fortessa SORP flow cytometer (BD Biosciences) and cell analyses were done using FACSDiva software (BD Biosciences) and FlowJo software (Treestar).

Plasma cytokine measurements

A customized 10plex multiplex FlowCytomix kit (eBioscience) was made to quantitate cytokines in mice plasma samples (IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-1 β , IL-17, IL-18; MCP-1; TNF α ; IFN γ). Experiments were done according to the manufacturer recommendations. Acquisitions were done with the LSR II Fortessa flow cytometer and analyses made with the FlowCytomix 2.4 Software (eBioscience).

Statistical analysis.

Statistical calculations were performed using GraphPad Prism, version 4.03. Results were analyzed by Student's unpaired *t*-tests with Welch's correction if variances were unequal. Data are presented as mean $\pm$ SEM. A difference was considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Macrophages survival and expansion leads to reduction in atherosclerotic lesion area.

To study the therapeutic impact of attenuating macrophage apoptosis in established atherosclerotic lesions, bone marrow progenitor cells harvested from Mø-hBcl2 /Apoe^{KO} and Apoe^{KO} mice were transplanted into lethally irradiated 25-weeks-old Apoe^{KO} mice. The experimental group was sacrificed at the age of 40 weeks (supplemental Figure 1). A similar approach was developed in an additional experimental group composed of western diet-fed LDLr deficient mice, which were irradiated at the age of 14 weeks and transplanted with bone marrow progenitor cells harvested from Mø-hBcl2 and control mice. The animals were sacrificed 15 weeks later (supplemental Figure 1). DNA from bone marrow cells of the two experimental models were analyzed for chimerism, and semiquantitative PCR demonstrated that >95% of the bone marrow cells of the recipient mice were replaced by donor cells, demonstrating a nearly complete replacement of bone marrow progenitor cells (data not shown). As expected, in the LDLr^{KO} hypercholesterolemic mice, the expression of hBcl2 macrophages was associated with a 30% reduction of atherosclerotic lesions in the aortic sinus as compared to non transgenic transplanted mice ($270\text{mm}^2 \pm 26\text{mm}^2$ vs $384\text{mm}^2 \pm 44\text{mm}^2$; Figure 1A). Similarly, in the Apoe^{KO} hypercholesterolemic model, the expression of the transgene hBcl2 in macrophages was associated with a 39% reduction of aortic lesions as compared to control mice ($205\text{mm}^2 \pm 43\text{mm}^2$ vs $337\text{mm}^2 \pm 35\text{mm}^2$; Figure 1B). Representative photomicrographs of the aortic roots are shown in Figure 1CD. Of note, the basal LDLr^{KO} and Apoe^{KO} groups had intermediate atherosclerotic lesions of $125\text{mm}^2 \pm 19\text{mm}^2$ and $160\text{mm}^2 \pm 34\text{mm}^2$ respectively. These results strongly suggest that even with substantial hyperlipidemia, evolution of pre-established lesions was significantly reduced by expression of the antiapoptotic gene hBcl-2 in macrophages.

Because lesion formation and progression are predominantly dependent on plasma cholesterol levels, we then assessed whether expression of hBcl2 in macrophages might alter cholesterol homeostasis. As shown in Figures 1E and 1F, LDLr^{KO} and Apoe^{KO} mice transplanted with bone marrow cells expressing hBcl-2, exhibited a consistent statistically significant 14% reduction in total and free plasma cholesterol concentration relative to control. At the time of sacrifice, bodyweight of mice transplanted with Mø-hBcl2 relative to control were similar within each experimental group (Supplemental Table 1).

All together, our data indicate that the effects of our transgene on atherosclerosis and on cholesterol homeostasis are indeed supported by BM-derived hematopoietic progenitor cells, in hypercholesterolemic conditions ranging from 250 to 420 mg/dl of total cholesterol.

Expression of hBcl2 in CD68 positive cells increases the whole macrophage content.

As demonstrated earlier in M ϕ -hBcl2 mice ¹⁴, splenic and peritoneal macrophages express the anti-apoptotic protein human Bcl2. To go further, we evaluated whether the transgene expression could impact lifespan of macrophages, and ultimately their numbers in body compartments. Based on the cell surface expression of the F4/80, CD11b and MHCII, we quantitated macrophage numbers in spleens and peritoneal cavities of LDLr^{KO} and Apoe^{KO} transplanted mice. In the LDLr^{KO} mice transplanted with M ϕ -hBcl2 bone marrow cells, a 23% increase in splenic macrophages and 25% increase in peritoneal macrophages were observed, as compared to non transgenic transplanted mice (Figure 2A). In Apoe^{KO}, comparable and significant increases in splenic and peritoneal macrophages were also observed (+23% and +36% respectively; Figure 2B). Based on these results, we concluded that repopulation of LDLr^{KO} and Apoe^{KO} mice with M ϕ -hBcl-2 bone marrow progenitor cells, results in a significant and specific elevation in the macrophage populations of all tissues studied.

Expression of hBcl2 in CD68 positive cells is associated with changes in monocyte subsets.

Our initial study indicated low expression of the hBcl2 protein in circulating monocytes which resulted in a monocytosis that was confirmed in these two new experimental conditions (+21% both in LDLr^{KO} and Apoe^{KO} mice transplanted with transgenic bone marrow cells; Figure 2C). Interestingly, recent experimental evidences support the existence of monocyte subsets commit for specific function before tissue infiltration. Briefly, Gr1^{high} monocytes express a number of inflammatory and proteolytic mediators, respond to inflammatory cues, and accumulate in inflammatory sites while Gr1^{low} monocytes appear to be anti-inflammatory, support tissue formation and patrol the vasculature ¹⁵. We therefore quantitated changes in these populations. As shown in Figure 2C, in the two hypercholesterolemic models, we observed a consistent elevation of Gr1^{low} monocyte subsets (+44% both in LDLr and Apoe deficient backgrounds) while the Gr1^{high} monocyte populations were unaffected. Altogether, these data suggest that the survival of macrophages mediated by hBcl-2 expression was also

associated with higher levels of Gr1^{low} monocytes upon ongoing atherosclerosis development resulting in a protective effect against atherosclerosis.

Expression of hBcl2 in CD68 positive cells is associated with changes in myeloid and lymphoid populations, and functions.

Macrophages interact with numerous other cell types and can act as antigen presenting cells representing an interface between innate and adaptive immunity ¹⁶. Tissue macrophages are also heterogeneous. Classically activated macrophages, or “M1 macrophages” are inflammatory, whereas alternatively activated macrophages, or “M2 macrophages”, display a more regulatory function ^{17 18 19 20}. The presence of these M1 and M2 macrophages in tissues may change cytokine environment, and can also impact the recruitment and functions of other immune cells. To address this question, we also quantified the content of different myeloid cell subpopulations and lymphocytes subsets in spleens and blood of transgenic- and control-transplanted mice in both LDLr^{KO} and Apoe^{KO} mice. In spleens of LDLr^{KO} recipient mice, myeloid dendritic cells subset (mDC) were increased in transgenic versus non transgenic transplanted mice (+14%; Figure 2D). By contrast, in spleens of Apoe^{KO} recipient model, the expression of the transgene hBcl2 in macrophages was associated with a 13% reduction of mDC as compared to control mice (Figure 2E). Percentages of lymphoid dendritic cells subset were unchanged in spleens of both models (data not shown). Surprisingly we observed that, the plasmacytoid population of the dendritic cell lineage defined as CD11c^{low} and PDCA-1⁺ (plasmacytoid dendritic cell antigen-1), was 6-fold increased in the LDLr^{KO} background, and 5-fold increased in the Apoe^{KO} model.

Because macrophages and pDCs might induce the activation and recruitment of T cells, including regulatory T-cells, we investigated T cell populations in blood. As shown on Figure 3A and 3B, no statistically significant changes were found in the cytotoxic T-lymphocytes content, both on the LDLr and Apoe deficient backgrounds, whereas the T-helper cell contents were reduced of 19% and 41% in LDLr^{KO} and Apoe^{KO} models respectively. Despite lower percentages of T-helper cells, the T-reg population (FR4⁺ and CD25^{high}) were significantly increased (+25% in LDLr and +24% in Apoe deficient backgrounds; Figure 3CD). By contrast, changes in the percentage of activated T-cells (CD44⁺ and CD62L^{neg}) in Mø-hBcl-2 relative to controls were opposed in the two hypercholesterolemic models (+19% in LDLr and -44% in Apoe deficient backgrounds; Figure 3CD).

We next investigated B cells populations in our two experimental models. Our initial study indicated elevated titers of plasma IgM natural antibodies, in Mø-hBcl-2/Apoe^{KO} as compared to Apoe^{KO} control mice. Since B1 cells are a significant source of natural IgM, thereby serving as a first line of defense against systemic bacterial and viral infections ^{21 22, 23}, we decided to quantify these cells populations. As shown in Figure 4AB, LB1 cells in the peritoneal cavity (main reservoir of B1 cells) were increased by 53% in the presence of the transgene CD68-hBcl2 in the Apoe^{KO} deficient model but not on the LDLr deficient one.

Expression of hBcl2 in CD68 positive cells is associated with changes in plasma cytokines profiles.

In our hypercholesterolemic models of plaque progression/regression, we also measured circulating cytokines. As shown in Table 1, we found that the expression of the hBcl2 anti apoptotic protein, under the control of the CD68 macrophage promoter, was associated with a statistically significant reduction in circulating levels of interleukin-18 (IL-18) and of IL-12p70 cytokines in mice on the LDLr^{KO} background, but not on the Apoe^{KO} background. IL-18 and IL-12p70 are, respectively, components of the inflammasome and of the pro-inflammatory Th1 response. A similar trend could be observed for interferon- γ (IFN γ) another Th-1 cytokine that was also slightly decreased in the plasma of Mø-hBcl-2 mice as compared to controls both in LDLr^{KO} (419 $\pm$ 96 pg/ml vs 182 $\pm$ 64 pg/ml) and Apoe^{KO} backgrounds (1202 $\pm$ 555 pg/ml vs 346 $\pm$ 136 pg/ml). Plasma levels of IL-6, IL-10, IL1 β , MCP-1 were not significantly different in LDLr^{KO} or Apoe^{KO} mice transplanted with Mø-hBcl2 bone marrow cells versus controls cells, while IL-5, tumor necrosis factor- α (TNF α) and IL17 were not detectable in the plasma of these experimental models. Based on these results, we concluded that mice transplanted with Mø-hBcl2 bone marrow cells exhibit significant reduction of immuno-inflammatory responses as compared to controls.

DISCUSSION

The present study, for the first time investigated the progression of established advanced lesions upon repopulation of ApoeKO or LDLrKO mice with bone marrow progenitor cells from Mø-hBcl2 mice and controls. Of note, in the ApoeKO experimental model mice were maintained on a chow diet during the entire study. Under such condition the potential protective effect of macrophages with higher survival capacity was evaluated in stable hypercholesterolemic conditions despite intrinsic changes in cholesterol levels within the model. By contrast in the LDLrKO experimental model, mice were first maintained on western diet, raising cholesterol levels up to 375 ± 12 mg/dl. Then, at the time of bone marrow transfer, the mice were shifted to a normocholesterolemic diet, therefore adding a dietary lowering strategy to the potential athero-protective effect of macrophages survival. Under both strategies the progressions of advanced lesions in the aortic sinus were diminished in the presence of macrophages expressing hBcl2. The degrees of protection were similar in both models, with no clear synergistic effect in the double therapeutic approach. These results are in accordance with our previous studies showing a protection in advanced plaque development of Mø-hBcl2/ApoeKO as compared to ApoeKO. Strikingly, in the former study, the main difference was the plasma total cholesterol levels that was near 900 mg/dl and were not significantly different in presence or absence of the hBcl-2 14. These differences suggest that the cholesterol lowering effects in the Mø-hBcl2 model are revealed under condition of mild hypercholesterolemia. These observations are in accordance with earlier observations in both mice and humans, which also suggest a role for mononuclear phagocytes in cholesterol homeostasis. For example, the hematopoietic growth factor macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF-1) was reported to lower cholesterol levels in rabbits and non-human primate models 24 25. On the opposite, op/op mice harbouring a mutation in the csf1 gene, which results in a reduction in monocyte and several tissue macrophage populations such as Küpffer cells 26, present a marked hypercholesterolemia when backcrossed in an Apoe deficient background 27. We also recently reported a similar phenotype in mice deficient for the major macrophage anti-apoptotic genes (Bcl-xKO Mac/ApoeKO mice); in this model Bcl-x deficiency in macrophages increased susceptibility to apoptosis. This results in the depletion of tissue macrophages in vivo, including its major pool, Küppfer cells. This deficiency in macrophage was associated with increased plasma cholesterol levels 28. Taken together, these observations indicate that mononuclear phagocytes may directly or indirectly influence cholesterol homeostasis. The mechanisms responsible for the decrease in total plasma

cholesterol levels in hypercholesterolemic Mø-hBcl2 mice were not explored in the framework of this study.

Expression of h-Bcl2 in different cell types of the immune system was previously characterized in Mø-hBcl2 mice. The protein was detected by flow cytometry in splenic macrophages, peritoneal macrophages as well as, to a lesser extent, in blood monocytes ¹⁴. This expression of h-Bcl2 was associated with enhanced macrophages content in spleen of Mø-hBcl2/ApoE^{KO} as compared to ApoE^{KO}, and was confirmed in our two new experimental models. Similarly, such larger content in macrophages were observed in the peritoneum cavities. These enhanced content of tissue macrophages in several tissues suggest an efficient resistance of cell expressing hBcl2 toward apoptosis, and are evocative of our previous findings. Indeed, macrophages content were also found to be elevated in early and cellular atherosclerotic lesions of Mø-hBcl2/ApoE^{KO} mice ¹⁴. These results suggest that accumulation of macrophages in tissues especially in early atherosclerotic lesions might not be obligatorily pro-atherogenic based on the larger size of early lesions. Alternatively these larger early lesions might be the reservoir of macrophages with anti-inflammatory, regulatory, and/or trophic functions as proposed in the recent literature. ^{29 30}. Therefore, we can hypothesize that enhanced numbers of macrophages in tissues including spleen, liver, peritoneum or atherosclerotic lesions might change neighboring cell functions, and might impact directly or indirectly respectively pDC content, plasma cholesterol levels, B1 cells content or atherosclerotic lesion growth.

These macrophages which display higher resistance to apoptotic stress might have protective functions in vivo and may represent a homologous subset among the heterogeneous population of macrophages recently described ^{31 32}. These are present within lesions ^{33 34 35}. We thus hypothesized that the function might be closer to M2 macrophages rather than M1. Indeed, it is commonly accepted that M1 macrophages are inflammatory and implicated in tissue destruction, whereas M2 macrophages are considered anti-inflammatory cells with the capacity to produce IL-10, TGFβ, and are implicated in tissue repair through increased production of extracellular matrix elements ³⁶. To go even further, other teams distinguish M2 macrophages with a repair phenotype and regulatory macrophages which are able to produce anti-inflammatory cytokines ³¹. In our experimental condition, the expression of the hBcl-2 in both models of hypercholesterolemia was associated with a predominance of Gr1^{low} over classic Gr1^{high} monocytes. Interestingly, a study analyzing the monocytes recruitment following

heart infarction showed that there is a sequential mobilization of Gr1^{low} and Gr1^{high} monocytes. In this model, M1 macrophages are derived from Gr1^{high} monocytes, whereas M2 macrophages are derived from Gr1^{low} monocytes³⁷. Thus, we could hypothesize that Gr1^{low} monocytes enhancement might favor increased recruitment of M2 macrophages population in tissues including atherosclerotic lesions, therefore dampening inflammation and favoring repair. More experiments are needed to investigate which phenotype is involved in our models. However, this possibility is still controversial. Several studies report that Ly6C^{low} monocytes (analogous to Gr1^{low} monocytes) patrol the vascular endothelium without being recruited in the intima³⁸. Other reported that Ly6^{high} monocytes (analogous to Gr1^{high} monocyte) efficiently accumulate in plaques, whereas Ly6^{low} monocytes may be less frequently recruited^{39 40}. Consistent with our hypothesis, in adipose tissues, both M1 and M2 macrophages are derived from blood monocytes subsets^{41 42}.

In this model of enhanced macrophage survival, we unexpectedly discovered a major increase of pDC in mice transplanted with Mø-hBcl2 bone marrow progenitor cells. Potential explanation for this phenotype could be attributed to expression of hBcl2 in pDC. This is unlikely, indeed, in another model developed by our team, in which hBcl2 expression was driven by CD11c promoter resulting in increased content in conventional DCs⁴³, we did not report increased content of pDC, whilst pDC normally express CD11c. Alternatively, pDC share a common precursor with macrophages and monocytes that may be responsible for its increase content due to potential expression of the promoter CD68^{44 45}. pDC are known to promote inflammation in response to virus or bacterial infections, or even to promote inflammatory secretion of type I interferon in auto-immune diseases⁴⁶. Surprisingly here, the pDC increase was associated with atherosclerotic protection, which is in accordance with a recent study reporting a protective effect of pDC in atherosclerosis through the reduction of Th1 activation and promotion of the Th2 non inflammatory pathway⁴⁷. Moreover, we quantitated T helper cells and T-reg lymphocytes, which were respectively decreased and increased in both models consistent with a previous study demonstrating a negative correlation between pDCs and T-helper cells, and a positive correlation between pDCs and T-reg lymphocytes⁴⁷.

Our observation at the local tissue levels were also reflected in the plasma levels of pro-inflammatory cytokines, specifically in the LDLr^{KO} mice expressing the transgene Mø-hBcl2 which exhibited a specific decrease in plasma IL12 and IL18. IL-12 is implicated in the Th1

immune response confirming the possible switch in Th phenotypes. IL-18 is a component of the inflammasome ⁴⁸ and it has been reported that Bcl-2 suppresses the NLRP1 inflammasome ^{49 50}, which also controls production of IL-18, ⁵¹ therefore providing an in vivo example of this relationship. Interestingly, in transplanted-Apoe^{KO} mice expressing the transgene Mø-hBcl2, we connected our actual findings our previous ones. We showed increase in natural T15/EO6 IgM content in Mø-hBcl2/Apoe^{KO} mice ¹⁴, which is in accordance with the increase in B1 lymphocytes content, known to produce IgM ^{23 21 22} and to afford athero-protection ⁵². These IgM antibodies have also been connected with effective efferocytosis through the binding of C1q to phagocytes, which could therefore compensate for the defective clearance observed in mice lacking the Apoe gene ⁵³.

In conclusion, this work shows that increasing macrophage lifespan is associated with a reduction in atherosclerosis processes in hypercholesterolemic mice. This effect is thought to be mediated by a global reduction in the inflammation status of animals and by reduction of cholesterolemia. Several mechanisms seem to be implicated. Although therapeutic modulation apoptosis in human macrophage may induce adverse effects, our strategy was successful to identify new potential pathways of atheroprotection.

TABLE 1

	B6 > LDLr KO	CD68-hBcl2 B6 > LDLr KO	p	Apoe KO > Apoe KO	CD68-hBcl2 Apoe KO > Apoe KO	p
	n=5	n=6		n=4	n=6	
IL-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MCP-1	1441 ± 263,5	1550 ± 385,3	0,829	1241 ± 325,2	1225 ± 338,1	0,975
IL-6	317,5 ± 59,19	238,9 ± 68,77	0,445	ND	ND	ND
IL-10	266,2 ± 85,18	205,8 ± 64,70	0,579	147,7 ± 26,56	147,0 ± 91,20	0,997
IL-18	11160 ± 1684	4461 ± 1292	0,009	9964 ± 4678	24800 ± 15810	0,409
IL-1β	79,30 ± 13,83	112,8 ± 57,20	0,600	105,2 ± 33,08	74,26 ± 38,06	0,636
IL-12 p70	307,3 ± 69,64	78,84 ± 30,80	0,011	126,7 ± 74,55	807,5 ± 569,7	0,289
IFNγ	419,4 ± 96,41	182,9 ± 64,71	0,096	1202 ± 555,1	346,8 ± 136,9	0,232
TNFα	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-17	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Cytokine measurements in mice serums. Individual mouse serum was collected and quantitated for several cytokines levels by flow cytometry with the eBioscience Flowcytomix assay. Values represent mean $\pm$ SEM. ND: not detected. (Values are expressed in pg/ml)

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Characterization of pathophysiological parameters. (1A) Aortic sinus lesion areas were quantified in LDLr deficient mice transplanted with transgenic CD68-hBcl2 bone marrow or control C57BL/6 (n = 10 and n = 8 respectively). (1B) Aortic sinus lesion areas were quantified in Apoe deficient mice transplanted with transgenic CD68-hBcl2 bone marrow or control Apoe^{KO} (n = 8 and n = 7 respectively). (1C and D) representative photomicrographs of lesions in both hypercholesterolemic mice transplanted with control or transgenic bone marrow. (1E) Total and free plasma cholesterol levels (TC and FC respectively) in LDLr^{KO} mice transplanted with hBcl2 or control bone marrow. (1F) Total and free plasma cholesterol levels (TC and FC respectively) in Apoe deficient mice transplanted with hBcl2 or control bone marrow. Values represent mean $\pm$ SEM. * p<0.05, ** p<0.01, # p<0.005.

Figure 2: Impact of hBcl2 expression on the macrophage lifespan and numbers in body compartments. (2A) splenic and peritoneal macrophage contents in LDLr deficient mice after transgenic or control bone marrow transplant. Values are expressed as percentage of analyzed leucocytes. (2B) splenic and peritoneal macrophage contents in Apoe KO mice after transgenic or control bone marrow transplant. Values are expressed as percentage of analyzed leucocytes. (2C) percentages of total CD115⁺ monocytes in blood leucocytes and distinction between Gr1^{high} and Gr1^{low} subpopulations in both hypercholesterolemic backgrounds with or without the hBcl2 protein expression. (2D) proportions of plasmacytoid and myeloid dendritic cells in spleens. Values represent mean $\pm$ SEM (LDLr^{KO} n = 8, CD68-hBcl2 LDLr^{KO} n = 10, Apoe^{KO} n = 10, CD68-hBcl2 Apoe^{KO} n = 8). * p<0,05, # p<0,005, # # p<0,001, \$ p<0,0005, § p<0,0001.

Figure 3: Decreased numbers of Th cells and increased in the Treg population by higher macrophage lifespans. (3A) percentage of cytotoxic T lymphocytes (CTL = CD3⁺ CD8⁺) and

Th cells in the circulating lymphocytes. The left graph show results in LDLr^{KO} mice and values from Apoe deficient mice are represented on the right picture. (3B) Quantifications of Treg subpopulations (CD4⁺ CD25^{hi} FR4⁺) and activated Th cells (CD44⁺ CD62L^{neg}) in the CD3⁺ CD4⁺ lymphocytes. Values represent mean $\pm$ SEM (LDLr^{KO} n = 8, CD68-hBcl2 LDLr^{KO} n = 10, Apoe^{KO} n = 10, CD68-hBcl2 Apoe^{KO} n = 8). * p<0,05, # p<0,005.

Figure 4: Peritoneal B cell contents. Proportions of B1 and B2 cells in CD45⁺ peritoneal lymphocytes. Left picture represent the comparison between LDLr deficient mice transplanted with either control or transgenic CD68-hBcl2 bone marrow. On the right same investigations in Apoe^{KO} background are represented. Values represent mean $\pm$ SEM (LDLr^{KO} n = 8, CD68-hBcl2 LDLr^{KO} n = 10, Apoe^{KO} n = 10, CD68-hBcl2 Apoe^{KO} n = 8). * p<0.05.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by an Award to P.L. from The Fondation de France. T.H. and P.L. gratefully acknowledge the award of a "Contrat d'Interface" by the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris/INSERM

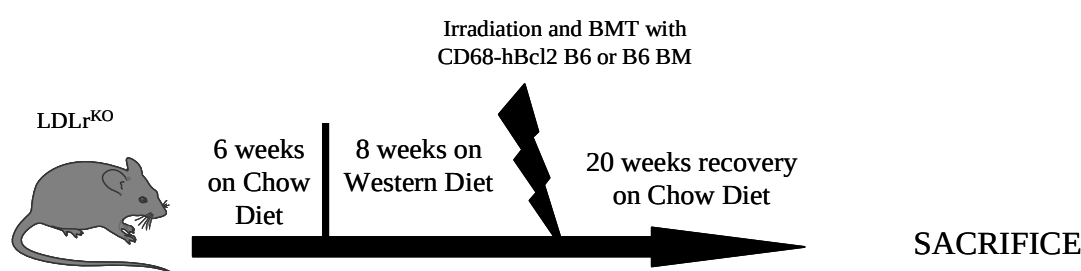
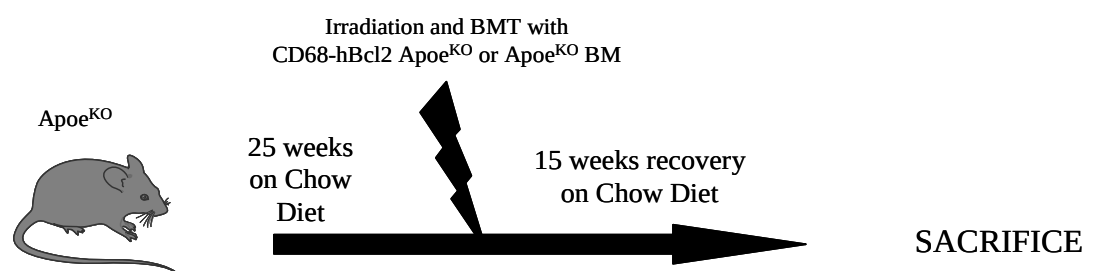
REFERENCES

1. Nissen, S.E., et al., Effect of Intensive Compared With Moderate Lipid-Lowering Therapy on Progression of Coronary Atherosclerosis. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2004. 291(9): p. 1071-1080.
2. Nissen, S.E., et al., Effect of Very High-Intensity Statin Therapy on Regression of Coronary Atherosclerosis. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 2006. 295(13): p. 1556-1565.
3. Steinberg, D. and A.M. Gotto, Preventing Coronary Artery Disease by Lowering Cholesterol Levels. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 1999. 282(21): p. 2043-2050.
4. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, Inflammation and Atherosclerosis. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-1143.
5. Hansson, G.R.K., et al., Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Circulation Research, 2002. 91(4): p. 281-291.
6. Björkerud, B. and S.r. Björkerud, Contrary Effects of Lightly and Strongly Oxidized LDL With Potent Promotion of Growth Versus Apoptosis on Arterial Smooth Muscle Cells, Macrophages, and Fibroblasts. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1996. 16(3): p. 416-424.
7. Cai, W.-j., et al., The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis, 1997. 131(2): p. 177.

8. Hegyi, L., et al., Macrophage Death and the Role of Apoptosis in Human Atherosclerosis. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, 2001. 10(1): p. 27.
9. Martinet, W. and M.M. Kockx, Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids and inflammation. *Current Opinion in Lipidology*, 2001. 12(5): p. 535-541.
10. Borner, C., The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 2003. 39(11): p. 615.
11. Saxena, A., J.D. McMeekin, and D.J. Thomson, Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *The Journal of Pathology*, 2002. 196(3): p. 335.
12. Martinet, W., et al., Gene Expression Profiling of Apoptosis-Related Genes in Human Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002. 22(12): p. 2023-2029.
13. Liu, J., et al., Reduced Macrophage Apoptosis Is Associated With Accelerated Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005. 25(1): p. 174-179.
14. Gautier, E.L., et al., Macrophage Apoptosis Exerts Divergent Effects on Atherogenesis as a Function of Lesion Stage. *Circulation*, 2009. 119(13): p. 1795-1804.
15. Swirski, F.K., R. Weissleder, and M.J. Pittet, Heterogeneous In Vivo Behavior of Monocyte Subsets in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009. 29(10): p. 1424-1432.
16. Gordon, S., Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response. *Cell*, 2002. 111(7): p. 927.
17. Gordon, S., Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(1): p. 23.
18. Martinez, F.O., et al., Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology*, 2006. 177(10): p. 7303-7311.
19. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology*, 2009. 27(1): p. 451-483.
20. Edwards, J.P., et al., Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006. 80(6): p. 1298-1307.
21. Martin, F. and J.F. Kearney, B-cell subsets and the mature -preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunological Reviews*, 2000. 175(1): p. 70.
22. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. *Immunity*, 2001. 14(5): p. 617.
23. Won, W.-J., M.F. Bachmann, and J.F. Kearney, CD36 Is Differentially Expressed on B Cell Subsets during Development and in Responses to Antigen. *The Journal of Immunology*, 2008. 180(1): p. 230-237.
24. Shimano, et al., Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). Vol. 587. 1990, Malden, MS, ETATS-UNIS: Wiley. 9.
25. Stoudemire, J.B. and M.B. Garnick, Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on plasma cholesterol levels. *Blood*, 1991. 77(4): p. 750-755.
26. Witmer-Pack, M.D., et al., Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *Journal of Cell Science*, 1993. 104(4): p. 1021-1029.
27. Qiao, et al., Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: Studies of osteopetrotic mice. Vol. 150. 1997, Bethesda, MD, ETATS-UNIS: American Society for Investigative Pathology.

28. Andrew I. U. Shearn, V.D., Emmanuel L. Gautier, Flora Saint-Charles, John Pirault, Edmund B. Rucker III, Sophie Beliard, John Chapman, Wendy Jessup, Thierry Huby and Philippe Lesnik, Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice. Submitted to ATVB, 2011.
29. Pollard, J.W., Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(4): p. 259.
30. Fleming, B.D. and D.M. Mosser, Regulatory macrophages: Setting the Threshold for Therapy. *European Journal of Immunology*, 2011. 41(9): p. 2498.
31. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(12): p. 958.
32. Gerber, J.S. and D.M. Mosser, Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc γ Receptors. *The Journal of Immunology*, 2001. 166(11): p. 6861-6868.
33. Chinetti-Gbaguidi, G., et al., Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR γ and LXR α Pathways / Novelty and Significance. *Circulation Research*, 2011. 108(8): p. 985-995.
34. Pourcet, B., et al., LXR α Regulates Macrophage Arginase 1 Through PU.1 and Interferon Regulatory Factor 8 / Novelty and Significance. *Circulation Research*, 2011. 109(5): p. 492-501.
35. Im, S.-S. and T.F. Osborne, Liver X Receptors in Atherosclerosis and Inflammation. *Circulation Research*, 2011. 108(8): p. 996-1001.
36. Tabas, I., Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005. 25(11): p. 2255-2264.
37. Nahrendorf, M., et al., The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007. 204(12): p. 3037-3047.
38. Geissmann, F., et al., Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, 2010. 327(5966): p. 656-661.
39. Tacke, F., et al., Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(1): p. 185.
40. Shi, C. and E.G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2011. 11(11): p. 762.
41. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(1): p. 175.
42. Shaul, M.E., et al., Dynamic, M2-Like Remodeling Phenotypes of CD11c⁺ Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes*, 2010. 59(5): p. 1171-1181.
43. Gautier, E.L., et al., Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis. *Circulation*, 2009. 119(17): p. 2367-2375.
44. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 2009. 27(1): p. 669-692.
45. Strobl, H., et al., Identification of CD68⁺lin⁻ Peripheral Blood Cells with Dendritic Precursor Characteristics. *The Journal of Immunology*, 1998. 161(2): p. 740-748.

46. Ichikawa, H.T., et al., Novel proteasome inhibitors have a beneficial effect in murine lupus via the dual inhibition of type I interferon and autoantibody secreting cells. *Arthritis & Rheumatism*, 2011: p. n/a.
47. Daissormont, I.T.M.N., et al., Plasmacytoid Dendritic Cells Protect Against Atherosclerosis by Tuning T-Cell Proliferation and Activity / Novelty and Significance. *Circulation Research*, 2011. 109(12): p. 1387-1395.
48. Duewell, P., et al., NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, 2010. 464(7293): p. 1357.
49. Faustin, B., et al., Mechanism of Bcl-2 and Bcl-XL inhibition of NLRP1 inflammasome: Loop domain-dependent suppression of ATP binding and oligomerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. 106(10): p. 3935-3940.
50. Bruey, J.-M., et al., Bcl-2 and Bcl-XL Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with NALP1. *Cell*, 2007. 129(1): p. 45.
51. Ting, J.P.Y., S.B. Willingham, and D.T. Bergstralh, NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(5): p. 372.
52. Kyaw, T., et al., B1a B Lymphocytes Are Atheroprotective by Secreting Natural IgM That Increases IgM Deposits and Reduces Necrotic Cores in Atherosclerotic Lesions / Novelty and Significance. *Circulation Research*, 2011. 109(8): p. 830-840.
53. Ehrenstein, M.R. and C.A. Notley, The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*, 2010. 10(11): p. 778.



Supplemental Figure 1. Experimental protocols.

(Upper panel) Apoe^{KO} mice were maintained on Chow Diet for 25 weeks. Then mice were lethally irradiated and transplanted with bone marrow cells from control Apoe^{KO} or CD68-hBcl2/Apoe^{KO} donors. After a 15 weeks recovery period on Chow Diet mice were euthanized for investigations. (Lower panel) 6 weeks old LDLr deficient mice were fed hypercholesterolemic Western Diet for 8 weeks before irradiation. Then mice were transplanted with transgenic bone marrow from mice expressing the hBcl2 protein in CD68⁺ cells or control C57BL/6 bone marrow. During recovery, mice were fed Chow Diet for 20 weeks before investigations.

	LDLR KO>B6	LDLR KO>68hBcl2	p	ApoE KO>ApoE KO	ApoE KO>68hBcl2	p
	n=8	n=10		n=4	n=6	
Body weight (g)	21,8±0,9	22,5±0,8	0,2	27,4±0,8	28,0±1,1	0,5
Total cholesterol (mg/dl)	292,2 ± 7,9	250,8 ± 7,1	0,001	405,0 ± 42,1	350,2 ± 26,2	0,3
Free cholesterol (mg/dl)	94,6 ± 3,5	81,6 ± 1,7	0,003	143,5 ± 11,3	124,7 ± 6,6	0,2
Aortic sinus lesion area (mm²)	384,2 ± 44,4	270,6 ± 26,2	0,03	314,9 ± 57,8	255,5 ± 72,1	0,6

Supplemental Table 1: physiological parameters.

Body weight, Total cholesterol (TC), Free Cholesterol (FC) and lesion area levels were quantitated at the sacrifice in each group of mice.

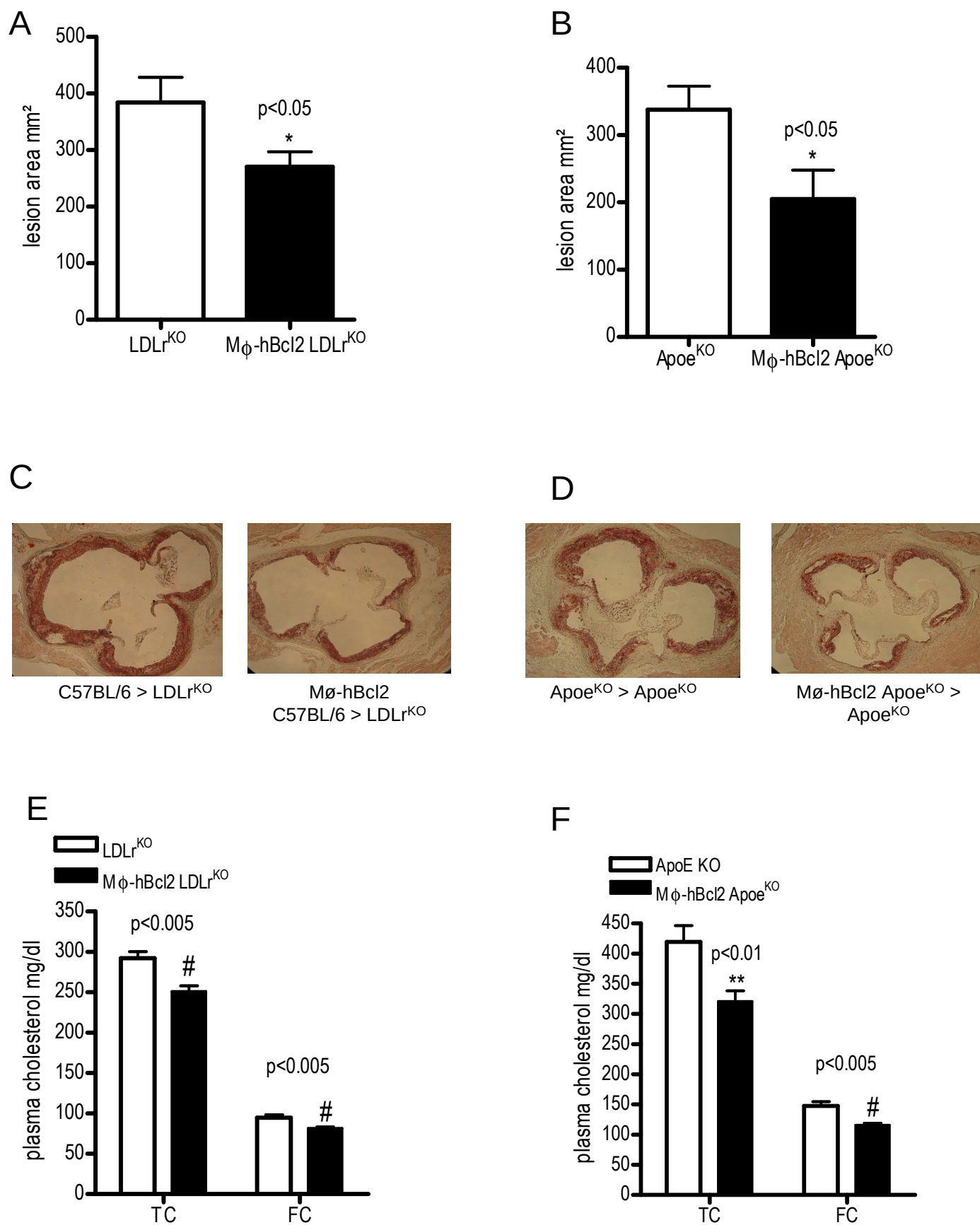


FIGURE 1

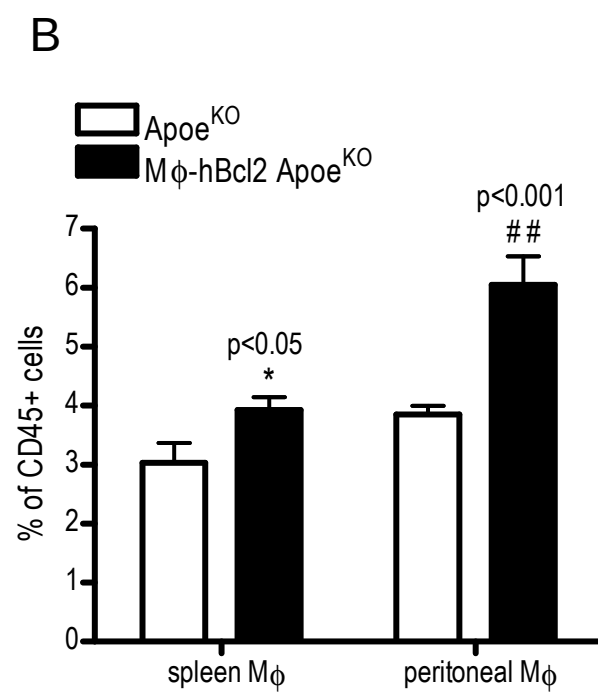
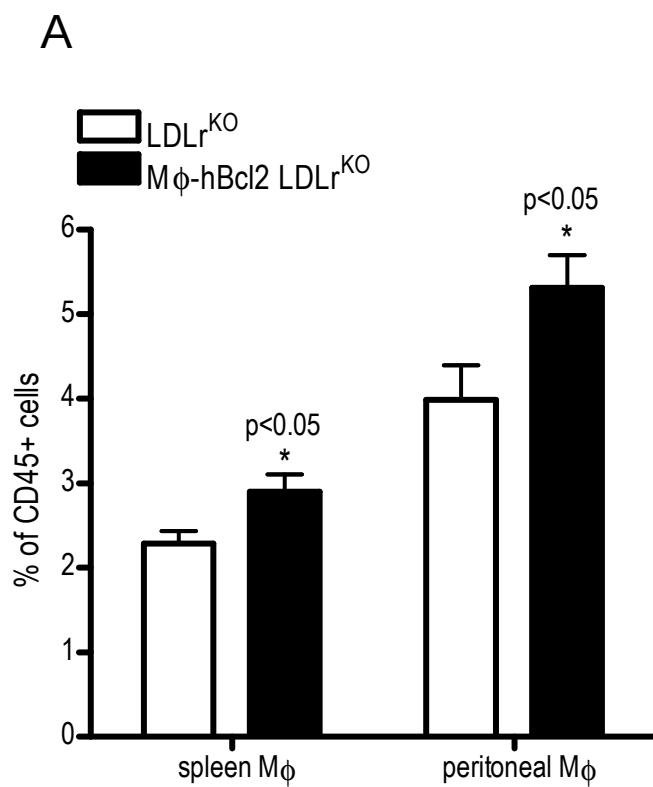


FIGURE 2

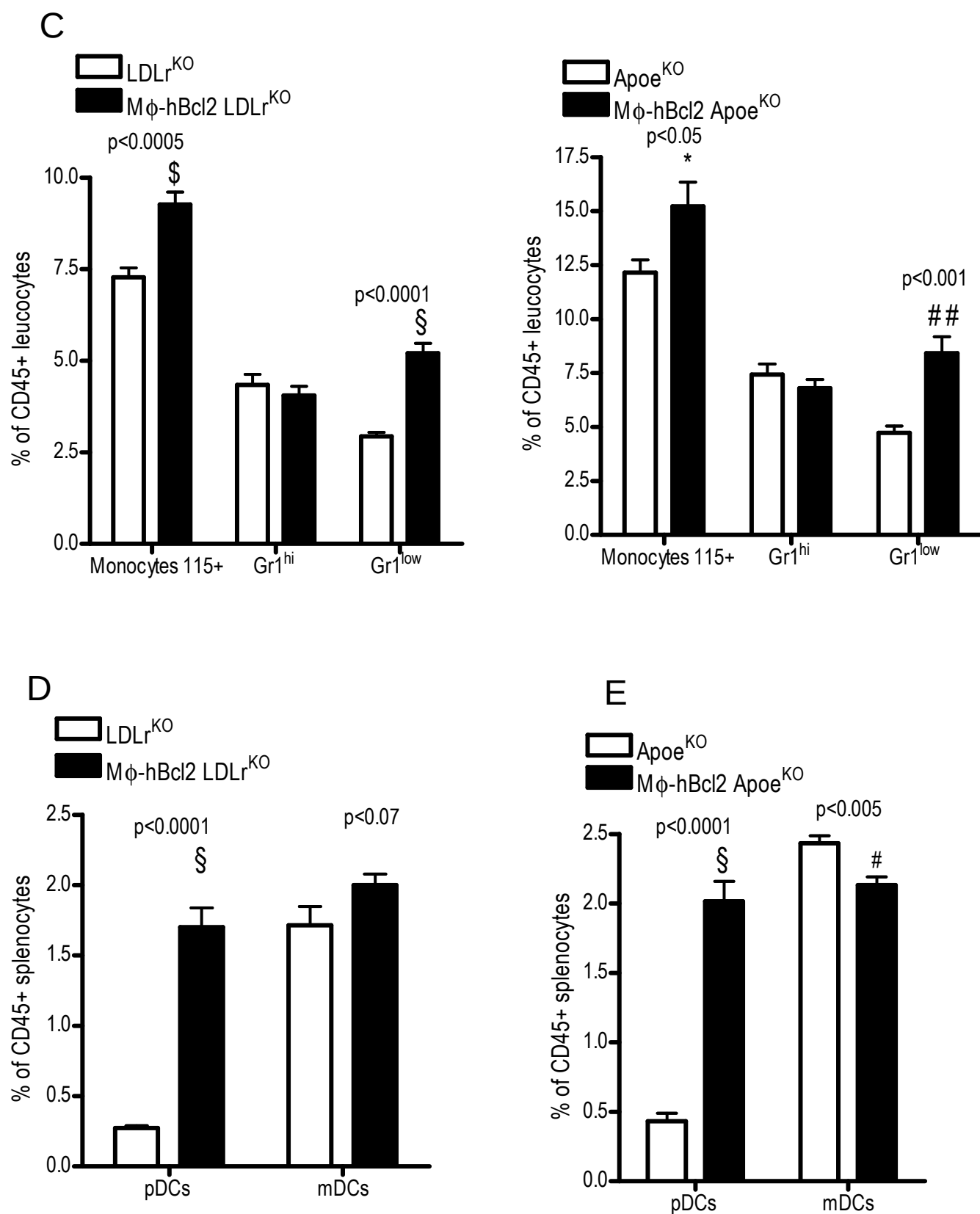


FIGURE 2

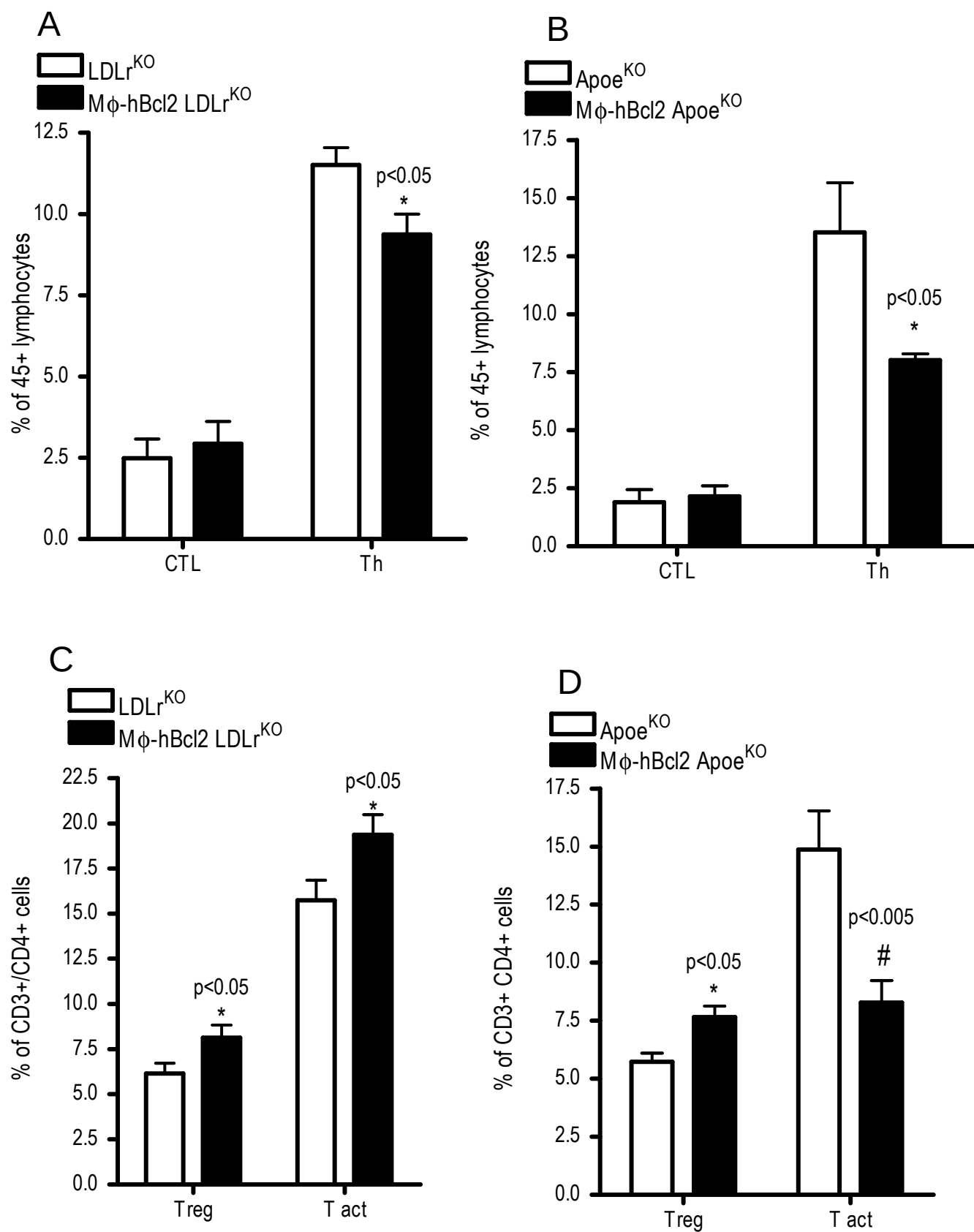


FIGURE 3

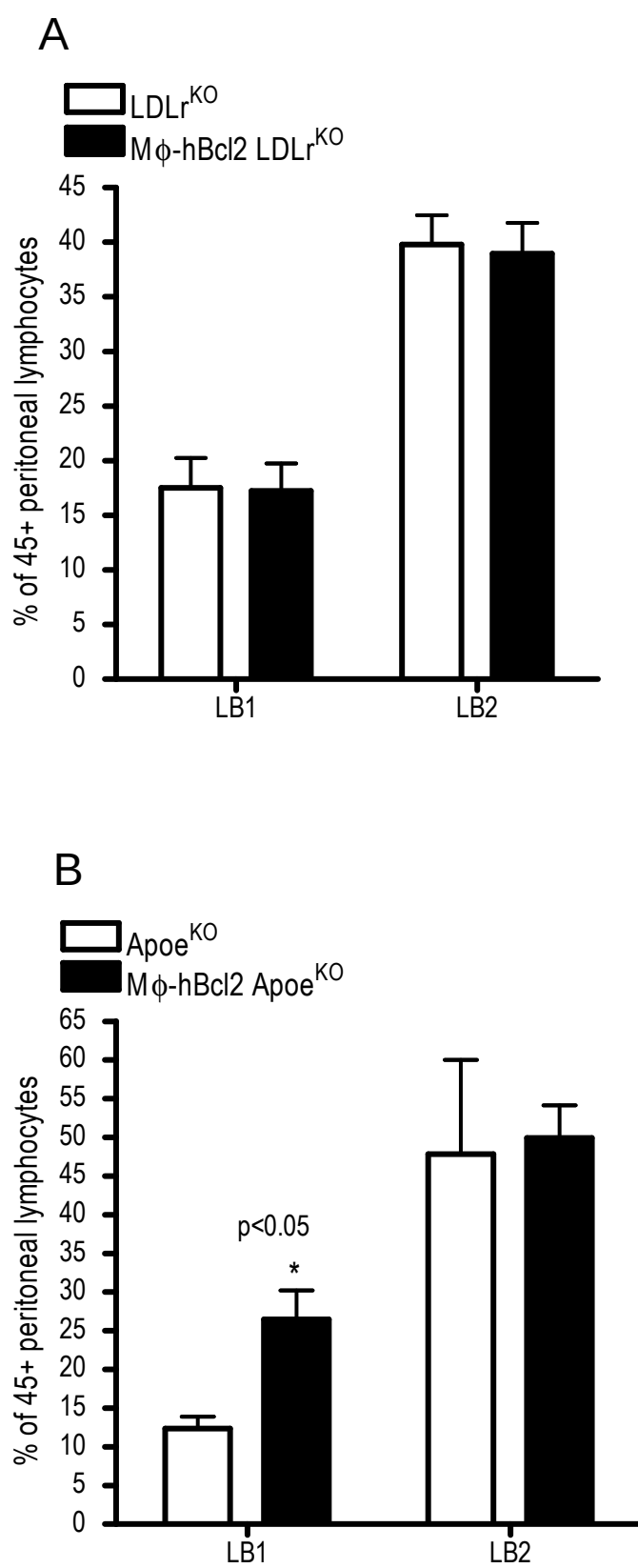


FIGURE 4

2. Article 2: Impaired macrophage lipid homeostasis and imbalance in dendritic cell subsets are key features in normolipemic xanthoma associated with monoclonal immunoglobulin.

Le xanthome plan normolipémique est une affection cutanée caractérisée par la présence de macules, papules, nodules ou plaques, de couleur jaune-orangée ou brune. L'histologie révèle une infiltration par des cellules spumeuses, « gorgées » de lipides, ayant des marqueurs de différenciation macrophagique en immunohistochimie. Dans notre étude, ces patients seront nommés sous les initiales NX (Normolipémique xanthoma).

Le xanthogranulome nécrobiotique est une forme plus sévère, cette forme de la pathologie présente des lésions papulo-nodulaires, jaune-orangées ou brunâtres, avec des télangiectasies, parfois ulcérées et confluentes, localisées préférentiellement dans la région palpébrale. En histologie on remarque une association de plages de nécrose, d'histiocytes spumeux, de cellules géantes de type Touton, et de cellules inflammatoires. Dans ces travaux ces patients sont notés NXG (normolipémique xanthogranuloma).

Cette pathologie est rare, il est rapporté dans la littérature l'étude de 63 cas de NX et 116 cas de NXG. Nous avons, grâce à une étude collaborative avec le service d'hématologie de l'Hôpital St-Louis, étudié 8 patients NX et 7 patients NXG. Nos travaux représentent à l'heure actuelle l'étude la plus importante sur la caractérisation de la pathologie et des mécanismes potentiellement impliqués. En effet, nous montrons que cette pathologie est associée à une dérégulation du métabolisme lipidique du macrophage, à l'expression d'un profil unique d'inflammation comprenant des cytokines inflammatoires mais aussi des récepteurs solubles à ces cytokines et des molécules d'adhésion et de recrutement augmentées. Enfin, l'étude des populations leucocytaires sanguines révèle une distribution des cellules dendritiques différente de celle d'individus sains. De plus, l'essai thérapeutique d'injection

intraveineuse d'immunoglobuline démontre une diminution de l'inflammation plasmatique et une normalisation de la répartition des leucocytes sanguins.

Impaired macrophage lipid homeostasis and imbalance in dendritic cell subsets are key features in normolipidemic xanthoma associated with monoclonal immunoglobulin.

Raphael Szalat^{1,2,6}, John Pirault^{3,4}, Jean-Paul Femand^{1,2,6}, Paul Robillard⁴, Maryline Olivier³, Flora Saint-Charles^{3,4}, Eric Bruckert^{3,5,6}, M. John Chapman^{3,5}, Alain Carrié^{3,5,6}, Philippe Giral^{3,5,6}, Maryse Guerin^{3,4,5}, Philippe Lesnik^{3,4,5,6} and Wilfried Le Goff^{3,4,5}

¹- Département d'immunologie Clinique, Hôpital Saint Louis, Paris, F-75010, France

²- EA3963, Université Paris 7 Denis Diderot, INSERM, IFR105, Institut Universitaire d'Hématologie, Paris, F-75475, France

³- INSERM, UMR_S939, Dyslipidemia, Inflammation and Atherosclerosis in Metabolic Diseases, Paris, F-75013, France.

⁴- UPMC Univ Paris 06, UMR_S939, Paris, F-75005, France

⁵- ICAN Institute of CardioMetabolism and Nutrition, Paris, F-75013, France.

⁶- Assistance-Publique Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, F-75013, France

Abstract.

Rationale. Xanthomatosis in normolipidemic individuals is a very rare disease and is frequently associated with circulating monoclonal immunoglobulin (MIg). Two forms were identified; diffuse plane normolipidemic xanthoma (NX) and necrobiotic xanthogranuloma (NXG), which mainly differ in the morphology and clinical aspect of skin lesions. However, only few cases have been reported in the literature and molecular and cellular mechanisms involved in the development of lesions in NX and NXG patients are largely unknown.

Objective. In order to provide further insights in the understanding of NX and NXG, an investigation in depth of plasma lipid phenotype, inflammatory status and circulating immune cells in a large series of 14 NXG and NX individuals was conducted in this study.

Results. We demonstrated that NX and NXG patients were characterized by a low HDL-C phenotype and a chronic inflammatory status. Moreover, capacity of macrophage to maintain cellular lipid homeostasis was altered in NX and NXG patients through distinct cellular mechanisms. Characterization of the immuno-inflammatory dimension in those patients highlighted a unique pro-inflammatory pattern which was not observed in other pathologies characterized by the presence of xanthoma or MIg. Analysis of circulating leukocytes clearly revealed an imbalance in dendritic cell (DC) subsets in NX and NXG patients, with an increased ratio of plasma myeloid DC1 to plasmacytoid DC (pDC) whereas that of myeloid DC2 to pDC was significantly reduced. More strikingly, treatment of a NXG patient with intravenous immunoglobulins (IvIg) led to a marked amelioration of clinical symptoms concomitant to a resolution of systemic inflammation and a normalization of circulating DC subsets

Conclusion. This study constitutes the first experimental investigation of a large group of patients with normolipidemic xanthomatosis associated to MIg. Our data reveal that NX and NXG patients exhibit a unique lipido-inflammatory pattern in which circulating DC subsets may represent reliable markers of those pathologies. Based on this new information, we propose that IvIg therapy might represent a beneficial therapy to treat normolipidemic patients displaying xanthoma associated to MIg.

Introduction.

Xanthoma are characterized by the deposition of lipid, mainly cholesterol, in large foam cells located in skin and tendons. Although the presence of xanthoma is usually observed in patients displaying hyperlipidemia, xanthomatosis may also occur in normolipidemic individuals, however such clinical manifestation is very rare ¹. In comparison to hyperlipidemic patients, lipid deposits are here exclusively restricted to the palpebral area designed as xanthelasma. Association of normolipidemic xanthomatosis with the presence of monoclonal immunoglobulin (MIg) is frequent and two forms have been identified: diffuse plane normolipidemic xanthoma (NX) and necrobiotic xanthogranuloma (NXG) ². Both NX and NXG are nearly-constantly associated with the presence of MIg and hypocomplementemia; however morphology and clinical aspect of skin lesions present major differences. Indeed, cutaneous lesions in NX as yellow maculae or papules, are diffuse and plane whereas those observed in NXG are firm papules, nodules or plaques. Histological analysis of NX and NXG lesions reveals the presence of foam cells, with however necrobiosis and giant cells, called Touton cells, only observed in NXG. We previously reported that spumous cells infiltrated in skin lesions from NX and NXG patients shared a common monocyte-macrophage origin ³.

Only little observations of NX (74) and NXG (141) have been reported in the literature ³, then pathophysiology of those pathologies remains unknown and very few data are available. The role of the MIg has been proposed with the hypothesis of an auto-antibody activity directed against lipoprotein ⁴. In addition, abnormalities in circulating monocytes levels with lipid accumulation and increased phagocytotic capacity was reported ⁵. A better understanding of mechanisms involved in NX and NXG development is therefore necessary in order to treat efficiently those patients.

Indeed, several treatments with controversial effects have been used to cure xanthomatosis associated with monoclonal gammopathy ³. Some of them are based on the ablation of lesions by surgical interventions ⁶ but these procedure only acts on the symptoms, not on the disease causality. Others treatments involve the use of chemotherapy drugs, antimetabolites, antimicrobial, plasmapheresis, however none of them was proven to be an efficient strategy to treat NXG or NX patients ^{2, 3, 7}. Emerging evidences of the implication of inflammation in this pathology allows the use of anti-inflammatory drugs which have so far not demonstrated their beneficial effects ². However a recent study published in 2010 ⁸ reported the treatment of two NXG patients with intravenous immunoglobulin (IvIg) which appeared to clearly improve clinical symptoms.

To provide further insights into the physiopathology of NX and NXG, an extensive clinical and experimental investigation of a large series of 14 patients displaying xanthomatosis associated with MIg (8 NX and 6 NXG patients) was conducted in this study. That included an extended analysis of plasma lipid and, inflammatory status as well as leukocytes subpopulations in those patients. Moreover, we also had the opportunity to study these parameters in a NXG patient treated with intravenous immunoglobulin (IvIg) for several weeks. The present study constitutes so far the more complete characterization of the cellular and molecular mechanisms that occur in NX and NXG patients and allowed the uncovering of a unique lipido-inflammatory phenotype in normolipidemic xanthomatosis associated to MIg.

Materials and methods.

Patients.

Patients were diagnosed between 2007 and 2011 suffering from NX (n=8) or NXG (n=6). Inclusion criteria were the presence of a MIg as detected by serum or urine electrophoresis and/or immunoelectrophoresis, xanthomatous cutaneous lesions confirmed by a biopsy showing either a foam cell infiltration or necrobiosis, cholesterol clefts and Touton giant cells for xanthoma and NXG, respectively. Diagnosis of associated monoclonal gammopathy was established according to the International Myeloma Working Group. In some cases, a histopathological examination was required to confirm potential extracutaneous lesions. Diagnosis of atherosclerosis was considered if patient had cardiovascular event in their background or during the follow-up and taking into account arterial Doppler evaluation when available. All patients gave a written consent to participate to this study. Blood samples were collected by venipuncture from the antecubital vein into sterile EDTA-containing tubes (final concentration of EDTA, 1mg/ml), and plasma separated immediately by low-speed centrifugation (2500 rpm) for 20 min at 4°C and stored at -80°C until use.

Biochemical Analysis.

The lipid contents of plasma and isolated lipoprotein fractions, total protein and apoAI, apoAII and ApoB were quantified with an Autoanalyzer (Konelab 20). Reagent kits from Roche Diagnostics and ThermoElectron were used for determination of total cholesterol and triglyceride levels, respectively. The levels of unesterified cholesterol and phospholipids were determined with commercial reagent kits (Wako Diagnostics). Cholesteryl ester (CE) mass was calculated as $(TC-FC) \times 1.67$, and thus represents the sum of the esterified cholesterol and fatty acid moieties. The Bicinchoninic acid assay reagent (Pierce) was utilized for protein quantification. Fasting plasma LDL-C was calculated using the Friedewald formula. HDL-C

levels were determined after dextran sulphate-magnesium precipitation of apoB-containing lipoproteins. Plasma ApoAI, ApoB and ApoAII concentrations were determined using immunoturbidimetric assays (ThermoElectron reagents and calibrators; Wako Diagnostics reagents and calibrators).

Isolation of HDL subfractions.

Lipoproteins were isolated from plasma by isopycnic density gradient ultracentrifugation in a Beckman Sw41 Ti rotor at 40000 rpm for 48 hours in a Beckman XL70 at 15°C as previously described ⁹. Lipoprotein mass concentration expressed in mg/dl was calculated as the sum of the concentrations in mg/dl of the individual lipid (free cholesterol, esterified cholesterol, phospholipids and triglycerides) and protein (as total protein content) components for each lipoprotein fraction.

Preparation and culture of human macrophages.

Monocytes were isolated on Ficoll gradients (Ficoll-Plaque PLUS, GE Healthcare) from the blood of either individual healthy normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS) or NXG patients and matching control individuals when indicated and subsequently differentiated into human monocytes-derived macrophages (HMDM) on plastic Primaria plates (Falcon) over a period of 10 days of culture in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat inactivated human serum (HS), 2mM glutamine, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 20ng/ml human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF). The human THP-1 monocytic cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in culture in 5% CO₂ at 37°C in RPMI medium containing 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 2mM L-glutamine and 80 U/ml penicillin / 80 µg/ml streptomycin. THP-1 monocytes were grown in the presence of 50 ng/ml phorbol 12-

myristate 13-acetate (PMA) for 3 days in order to induce differentiation into macrophage-like cells.

Cellular free cholesterol efflux assays.

Human THP-1 macrophages were labeled with 1 μ Ci/ml [³H]cholesterol for 24 hours in the presence of 10% control or patients' serums in RPMI media or 50 μ g/ml acetylated LDL (acLDL) in a RPMI medium containing 2mM Glutamine, 50mM Glucose and 0.2% BSA (RGGB) when indicated. Human macrophages were then equilibrated in RGGB medium for an additional period of 16 hours. Cellular cholesterol efflux to either 2.5% control or patients' serums or 15 μ g/ml of HDL-PL subfractions was assayed in RGGB medium for a 4-hour chase period. Finally, culture media were harvested and cleared of cellular debris by brief centrifugation. Cell-associated radioactivity was determined by extraction in hexan-isopropanol (3:2), evaporation of the solvent and liquid scintillation counting (Wallac Trilux 1450 Microbeta). The percentage of cholesterol efflux was calculated as $100 \times (\text{medium cpm}) / (\text{medium cpm} + \text{cell cpm})$.

Determination of cellular cholesterol mass.

Human THP-1 macrophages and HMDM were incubated for 48 hours in the presence of 10% control or patients' serums in RPMI media. Mass of esterified and free cholesterol in human macrophages was quantified using the Amplex Red cholesterol assay kit (Molecular Probes) as previously described¹⁰.

Recognition of lipoprotein-associated antigens by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Lipoprotein subfractions were prepared as described above and used (100 μ l) to coat 96-well plates (MaxiSorp ImmunoPlate, Nunc) overnight at 4°C (protein concentration at 5 μ g/ml). Then, wells were washed five times with 0.05% PBS/Tween20 and blocking was performed for 1h with PBS/1%BSA at RT. Diluted plasma samples (1/200) were incubated for 2h at RT and after five washing steps, 100 μ l of biotinylated mouse anti-human IgG (1/10000 dilution, BD Biosciences) were added for 1h at RT. Following incubation, wells were washed five times and incubated with 100 μ l Avidin-HRP (1/1000 dilution, eBioscience) for 30 min at RT. After extensive washing (x7), reaction was initiated by adding TMB substrate reagent (eBioscience) for 15 minutes at RT and was stopped by the addition of 50 μ l of 2N sulfuric acid solution. Signal was quantified by measuring OD at 450nm using a microplate reader (Dynex Technologies).

Analysis of blood monocyte and dendritic cell subsets by flow cytometry.

Fresh blood punctures in EDTA tubes was immediately centrifuged for 20 min at 3000 rpm (4°C) and cell pellet was resuspended with an equal volume of cold PBS. A 100 μ l- or 300 μ l- aliquot sample was used for immunostaining of monocyte or dendritic cells, respectively. Samples were blocked with 200 μ l of 1/400 diluted Fc Blocking reagent (Miltenyi), and then incubated with corresponding antibodies for 20min at 4°C protected from light exposure. If needed, 50 μ l of 1/200 diluted streptavidin PE Texas Red (BD Biosciences) was added and samples were incubates for 20 min at 4°C protected from light exposure (final dilution 1/1400). Then, blood red cells were lysed and leukocytes were fixed with 700 μ l (for lymphocytes and monocytes) or 1300 μ l (for DC) of Versafix solution according to the manufacturer's instructions (Beckman Coulter). Chemokine receptors CX3CR1 and CCR2 were detected with CX3CR1 PE (MBL) and CCR2 PE (R&D System). Distinction of lymphocyte subsets were based on different expression patterns of surface markers: T helper

cells (45+, 3+, 4+, 8-), naïve T helper lymphocytes (25-, 127+), T regulatory cells (25+, 127-), cytotoxic lymphocytes (45+, 3+, 4-, 8+) and lymphocytes B (HLA-DR+, 19+). Monocyte subsets were discriminated as classical (14++/16-/CCR2hi), intermediate (14++/16++) and non classical (14dim/16++/CX3CR1hi) populations and DC subsets were identified from the plasmacytoid (11c-, 123+, BDCA2+), myeloid 1 (11c+, BDCA1+, BDCA3-) and myeloid 2 lineages (11c+, BDCA1-, BDCA3+). Samples were acquired on LSR II FORTRESSA SORP (BD Biosciences) and analyzed in FACSDIVA software (BD Biosciences). Absolute quantification of leucocytes was assessed using the TRUCOUNT method (BD Biosciences).

Analysis of circulating biomolecules.

Adhesion molecules and inflammatory cytokines in plasma from control and patients were quantified using a semi-automated Biochip Array Technology analyzer (Evidence Investigator, Randox) as previously described ¹¹.

Statistical analyses.

Data are shown as mean $\pm$ SEM. Experiments were performed in triplicate. Comparisons of 2 groups were performed by a 2-tailed Student's *t* test and comparisons of 3 or more groups were performed by ANOVA with Dunnett post-test. All statistical analyses were performed using Prism software from GraphPad (San Diego, CA, USA).

Results.

Low plasma HDL-cholesterol and increased inflammation are major features associated to NX and NXG patients.

Examination of clinical parameters in patients recruited in this study clearly confirms the NX and NXG phenotype as illustrated by the presence of a monoclonal gammopathy and xanthomatous cutaneous lesions (Supplemental Table I). Moreover, all patients were characterized by high levels of CRP reflecting the chronic inflammation occurring in NX and NXG diseases.

As previously described, both NX and NXG patients were not hyperlipidemic with plasma total cholesterol, apolipoprotein B and LDL-cholesterol levels in normal ranges. To note that NX3 patient displayed elevated plasma triglycerides levels whereas NXG6 patient was associated to a severe hypolipidemia. Occurrence of cardiovascular events in those patients was a rare feature with only 2 patients in the cohort having experienced cardiovascular complications (Supplemental Table 1). Interestingly, both NX and NXG patients were frequently associated to low HDL-C levels ($<40\text{mg/dL}$) as compared to normolipidemic individuals (Supplemental Table I and Table 1). In concordance with the low HDL-C phenotype, plasma apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-II levels were found reduced in NX ($1.14\pm 0.18\text{g/L}$, $p=0.001$ and $0.20\pm 0.05\text{g/L}$, $p=0.003$, respectively) and NXG ($1.18\pm 0.34\text{g/L}$ and $0.14\pm 0.05\text{g/L}$, $p=0.002$, respectively) patients as compared to control subjects ($1.55\pm 0.06\text{g/L}$ and $0.34\pm 0.04\text{g/L}$, respectively) (Table 1). In addition, plasma apolipoprotein E concentrations was significantly reduced in NXG patients ($1.71\pm 1.10\text{mg/dL}$, $p=0.019$) when compared to control individuals ($4.64\pm 1.22\text{mg/dL}$) whereas those in NX patients were not significantly different ($4.98\pm 3.28\text{mg/dL}$).

Despite an accumulation of lipids in the skin, NX and NXG patients were not hyperlipidemic and rather displayed a low HDL-C phenotype together with an increased inflammatory status.

Sera from NX and NXG patients contribute to cholesterol accumulation in human macrophages.

Immunohistochemistry of skin biopsies from both NX and NXG patients led us to observe very recently that cells infiltrated in cutaneous lesions were positive for the CD163 staining, a marker specific to monocyte / macrophage^{3, 12}. Since an impaired lipid homeostasis in macrophages is frequently observed in pathologies associated to cellular lipid deposits¹³, we have explored the possibility that NX and NXG diseases were associated to a specific accumulation of lipid in macrophages. To this end, we have tested the capacity of serum from NX and NXG individuals to promote both the loading as well as the efflux of cholesterol in human macrophages.

As shown in Figure 1A, the incubation of primary culture of human monocyte-derived macrophages with serum from NXG or NX patients was accompanied by a significant increase of the cellular cholesterol content in those cells (+14%, $p < 0.05$ and +21%, $p < 0.0005$, respectively) as compared to those from control individuals; such an effect being not observed with serum from individuals displaying a monoclonal gammopathy in the absence of any cutaneous lesions. Similar observations were made when the loading capacity of serum from all NXG and NX patients was evaluated in human THP-1 macrophages (Supplemental Figure I). In order to strengthen the physiological relevance of those findings, circulating blood monocytes from either a normolipidemic control individual or the NXG2 patient were isolated and differentiated into macrophages and incubated in the presence of autologous sera or serum from a subject displaying familial hypercholesterolemia (FH) (Figure 1B). Incubation

of NXG2 macrophages with autologous serum led to a marked elevation of cellular cholesterol content (+33%, $p < 0.05$) at a level similar to that observed with FH serum in comparison to control macrophages cultured with autologous serum. Interestingly, cellular cholesterol content was significantly more elevated in NXG2 macrophages than in control macrophages when cultured with control serum (+13%, $p < 0.05$), indicating that not only the capacity of serum but likely also that of macrophage from NXG2 patient to load cholesterol was exacerbated.

We next addressed the hypothesis that the elevated cholesterol deposition in macrophages observed in NX and NXG might result from an increased recognition of a specific antigen on lipoprotein by IgG; such a lipoprotein-IgG complex might indeed be internalized by macrophages through a receptor distinct of the LDL-R and then might contribute to cellular cholesterol accumulation. We demonstrated that sera from NXG but not from NX patients displayed a ~7-fold higher capacity than control sera to recognize small dense LDL-5 subfraction when tested in enzyme-linked immunosorbent assay (Figure 1C).

Impaired capacity of sera from NXG patients to promote free cholesterol efflux from human macrophages.

However the elevated capacity of sera from NXG and NX patients to load human macrophages with cholesterol could also result from an impaired capacity of those sera to promote cellular free cholesterol efflux from macrophages through the reverse cholesterol transport (RCT) pathway which mediates the return of cholesterol from peripheral cells, such as macrophages, to the liver for elimination. Indeed, as shown in Figure 1D, sera from NXG patients have a marked reduced capacity to promote free cholesterol efflux from THP-1 macrophages (-33%, $p < 0.05$) than control sera whereas that of NX sera was not altered. Analysis of the lipoprotein profile (Figure 1E) revealed that although the distribution of apoB-

containing lipoproteins, i.e. VLDL and LDL, appeared similar in patients and in controls individuals, on the other hand the profile of HDL particles, i.e. HDL2 and HDL3, which constitutes the major physiological cholesterol acceptors from cells, was found profoundly altered in both NX and NXG patients. Indeed, plasma HDL2 and HDL3 levels were strongly reduced in NX subjects whereas in NXG patients, a diminution of plasma HDL3 levels was concomitantly observed with an increased amount of large HDL2 particles (Figure 1E). Finally separation of HDL particles in five subfractions by isopycnic density gradient ultracentrifugation clearly indicated that the capacity of small HDL3c from both NXG and NX patients to promote free cholesterol efflux from human THP-1 macrophages was reduced (-25% and -19%, $p < 0.05$, respectively) when compared to HDL3c from control individuals (Figure 1F); an effect which was compensated in NX patients by an increased efflux capacity of HDL3b particles.

Taken together, our findings clearly revealed that cholesterol homeostasis was impaired in macrophages upon incubation with sera from NX and NXG patients. Indeed, both NX and NXG sera allowed an accumulation of cholesterol in macrophages whereas only NXG sera exhibited a reduced cholesterol efflux capacity from those cells.

Unique inflammatory pattern in xanthomatosis associated with monoclonal gammopathy.

Numerous molecules and cells present in the circulating environment may affect the monocyte / macrophage lineage, some with pro-inflammatory properties and others with tolerogenic specialization. To better characterize the inflammatory status of NX and NXG patients, circulating inflammatory cytokines as well as adhesion molecules were quantified in plasmas from those patients using biochip arrays (Figure 2) and compared to amounts detected in plasmas from normolipidemic control individuals (Ctrl) and familial

hypercholesterolemia (FH) patients; such latter patients being characterized by high plasma cholesterol levels, the presence of xanthoma but no monoclonal gammopathy. We clearly observed that NX and NXG patients displayed a marked increase of plasma pro-inflammatory cytokines (IFN γ , TNF α , IL-6 and IL-8), soluble cytokine receptors (sIL-6R, sTNFRI and sTNFRII), chemokines (MCP-1 and MIP-1 α) and adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) as compared to Ctrl and FH subjects (Figure 2). Such an inflammatory pattern was neither observed in individuals displaying a monoclonal gammopathy in the absence of any cutaneous lesions (data not shown). However, although NX and NXG patients shared a common pro-inflammatory pattern, it is interesting to note that a decrease in plasma IL-2 levels (-26%, $p=0.08$ vs Ctrl) together with an increase in those of IL-15 (2-fold, $p<0.005$ vs Ctrl) specifically signed the NXG pattern whereas that of NX was distinguished by a 3.7-fold ($p<0.05$) elevation of plasma EGF levels.

Increased subsets of pro-inflammatory dendritic cell in NX and NXG patients.

We next characterized the immune environment of NX and NXG patients by monitoring circulating leukocytes of those subjects (Figure 3). Monitoring of CD45-positive mononuclear leukocytes (lymphocytes, monocytes and dendritic cells (DC)) in fresh blood samples by flow cytometry clearly revealed that the number of circulating mononuclear leukocytes was decreased by 57% ($p<0.05$) in NXG patients as compared to NX and Ctrl individuals (Figure 3A) whereas populations of neutrophils were not altered (Supplemental Figure IIB). A more detailed analysis of leukocyte population (Figure 3 and Supplemental Figure II) indicated that the absolute count of T helper lymphocytes (Th: CD3+, CD4+, CD8-), naive T helper (naïve Th: CD3+, CD4+, CD8-, CD25-, C127+) (Figure 3B) as well as of cytotoxic lymphocytes (CTL: CD3+, CD4-, CD8+) (Supplemental Figure IIA) were reduced in NXG patients (-63%, -61% and -83%, respectively, $p<0.05$) whereas those of regulatory T cells (Treg: CD3+,

CD4+, CD25+, CD127-) (Figure 3B), B lymphocytes (LB: CD19+) and natural killer cells (NK and NKT) (Supplemental Figure IIA) were not different compared to controls (Fig 3B).

Study of the circulating monocyte population, which are a potent precursor of tissue macrophages, was analyzed as classical (CD14⁺⁺, CD16⁻), intermediary (CD14⁺⁺, CD16⁺) and non classical subsets of monocytes (CD14^{dim}, CD16⁺⁺) and presented in Supplemental Table II.

Dendritic cells (DC) was reported to play a crucial role in the control of dermal inflammation¹⁴ and analysis of DC subsets (plasmacytoid (pDC), myeloid 1 (mDC1) and 2 (mDC2)) in plasmas from NX and NXG patients led us to observe that circulating pro-inflammatory mDC1 levels were found increased in NX patients (+79%, $p < 0.05$) whereas those of mDC2 were decreased in both NX and NXG subjects (-88% and -84%, respectively, $p < 0.005$) in comparison to control individuals (Figure 3C). Since mDC1 and mDC2 subsets have antagonist properties in controlling inflammation, we found more relevant to study ratios of DC subsets. Indeed, such a representation of the DC population was more representative of the inflammatory status in patients. Strikingly, analysis of mDC1/pDC, mDC2/pDC (Figure 3D) and mDC1/mDC2 ratios (Figure 3E) clearly highlighted the increased pro-inflammatory status of NX and NXG patients, as testified by the high relative proportion of pro-inflammatory DC subset in those subjects.

Our findings therefore revealed that although NXG patients exhibited leucopenia which mostly resulted from a decreased number of circulating lymphocytes (Th, naive Th and CTL) and monocytes, both NXG and NX patients were characterized by a marked increase of the pro-inflammatory DC population.

Resolution of the inflammatory pattern but increase of lipidemia upon intravenous immunoglobulin therapy in a NXG patient.

A recent study reported the treatment of two NXG patients with intravenous immunoglobulin (IvIg) which appeared to clearly improve clinical symptoms ⁸. Since NXG was associated with a chronic inflammation in our study, this therapeutic strategy was considered as potentially appropriate for NXG subjects. Thus, the NXG2 patient was treated with IvIg infusions every 3 weeks at the dose of 2g/kg and plasma lipid, circulating cytokines and adhesion molecules as well as leucocytes were monitored for 12 weeks.

As soon as the first infusion, it is to note that the patient reported beneficial effects of the treatment with burning sensation disappearance and clinical examination detected a lower inflammation and infiltration at the cutaneous lesion sites associated to a decreased lesion size. Treatment of NXG2 patient with IvIg was accompanied by a marked attenuation of the pro-inflammatory pattern as illustrated by the significant decrease of plasma IL-6 levels (-56%, $p < 0.05$, Fig. 4A) together with the 2.2-fold increase ($p < 0.05$) of those of IL-10 (Fig. 4C). More strikingly, a trend to normalization of circulating amounts of soluble cytokine receptors sIL-6R (Fig. 4E), sTNFRI (Fig. 4G) and sTNFRII (Fig. 4B), MIP-1 α chemokine (Fig. 4F) as well as IL-15 (Fig. 4D) was observed as soon as the first injection; this latter cytokine signing the NXG inflammatory pattern. Moreover, although IvIg infusions increased plasma HDL-C, apoA-I, apoA-II and apoE levels in the NXG2 patient, a marked elevation of all measured plasma lipid parameters (TC, TG and apoB) was equally observed upon IvIg therapy (Figure 5). Finally, analysis of leukocytes population did not allow us to detect any changes in the lymphocytes content (data not shown) whereas a normalization of monocyte subsets was operated after 12 weeks (Supplemental Figure III). However the more significant finding was the complete restoration of the mDC1/pDC, mDC2/pDC and mDC1/mDC2 ratios in the NXG2 patient (Figure 6), characterized by the robust decrease of the pro-inflammatory mDC1 subset together with an augmentation of the mDC2 subset.

Taken together, IvIg infusions in the NXG2 patient appeared to resolve the pro-inflammatory pattern and this, no longer than after a 12-week therapy, however this beneficial effect was accompanied by an increase of plasma lipidemia.

Discussion.

We presently reported that normolipidemic xanthoma associated with monoclonal immunoglobulin (MIg), referred as diffuse plane normolipidemic xanthoma (NX) and necrobiotic xanthogranuloma (NXG), are characterized by an impaired macrophage cholesterol homeostasis and an unique inflammatory pattern marked by a profound imbalance in circulating dendritic cell subpopulations. This study constitutes so far the most extensive clinical and experimental investigation of cellular and molecular mechanisms involved in those pathologies with the identification of intravenous immunoglobulin (IvIg) as a potential efficient therapeutic option to treat patients affected by such diseases.

Analysis of skin biopsies from NX and NXG patients previously led us to identify that foam cells observed in the skin lesions were positive for CD163, a specific marker of monocyte / macrophage ³, thereby suggesting that those mononuclear cells drive lipid accumulation in cutaneous lesions. Indeed, we here demonstrated that sera from NX and NXG patients were able to promote cholesterol accumulation in human macrophages supporting the contention that lipid accumulation in skin lesions observed in those individuals likely results from a specific cholesterol deposition in CD163 positive macrophages. Mechanisms involved in such a cellular lipid accumulation appear to be multiple and to differ between NX and NXG patients. Among them, 1) sera from NXG patients exhibited an altered capacity to promote free cholesterol efflux from macrophages, the first step of Reverse Cholesterol Transport (RCT) which was largely described to prevent cellular cholesterol accumulation ¹⁵. Such an effect was explained by the reduction of both quantity (HDL-C levels <40mg/dL) and efflux capacity (HDL3c) of HDL particles in NXG patients which are the main cholesterol acceptors from cells ¹⁶. Interestingly, although NX patients also displayed low HDL-C levels and an altered capacity of HDL3c to promote cholesterol efflux from macrophages, the overall cholesterol efflux capacity of NX sera was not reduced in our experimental conditions.

Indeed, those deleterious effects were very likely counterbalanced by the increased capacity of HDL3b from NX patients to promote cholesterol efflux from macrophages. However in addition to an impaired cholesterol efflux capacity, 2) serum from NXG patients displayed an increased recognition of antigens specific to small dense LDL, i.e. LDL-5, as compared to NX and control sera; such particles being described to have a higher capacity to promote foam cell formation in the context of atherosclerosis ¹⁷. Indeed small dense LDL particles are poorly recognized by the LDL-R and have a low resistance to oxidation and then are considered as being the more efficient lipoprotein subclass for promoting lipid accumulation in macrophages ¹⁷. It is interesting to note that a higher recognition of oxidized LDL (MDA-LDL) was equally observed by ELISA with NXG sera as compared to NX or control sera. Taken together, those findings led us to suggest that MIg in NXG are characterized by the presence of IgG that specifically recognize small dense LDL and that such IgG-LDL-5 complexes could favor the uptake and the subsequent accumulation of cholesterol in macrophages through the scavenger receptor pathway. An interaction between MIg and lipoprotein was proposed to explain lipid accumulation in macrophages in cutaneous xanthoma ¹⁸, however the present study represents the first report of a specific interaction of MIg with a specific lipoprotein subfraction in NXG patients. Finally, 3) isolation of blood monocyte-derived macrophages from the NXG2 patient indicated that not only the capacity of serum but also that of patient's macrophage to accumulate cellular cholesterol was increased. This observation was coherent with the study from Matsuura et al. ⁵ which reported that macrophages from a NXG patient displayed an elevated cellular cholesterol content and were characterized by an increased uptake of modified LDL when compared to control macrophages.

The present study clearly put forward that normolipidemic xanthoma associated with MIg was associated to a chronic inflammation and we here characterized for the first time in

details the inflammatory pattern of NXG and NX patients by measuring more than 30 circulating cytokines and adhesion molecules. In addition to an increase of CRP and classical pro-inflammatory cytokines levels (IL-6, TNF α , IFN γ and IL-8) in plasma from those individuals, NXG and NX patients exhibited a unique inflammatory pattern illustrated by an elevation of plasma levels of adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1), chemokines (MCP-1) and soluble cytokine receptors (sTNFR1, sTNFR2 and sIL-6R). However although NX and NXG patients shared a common inflammatory pattern, plasma IL-15 levels were specifically augmented in NXG whereas a specific increase of EGF was only observed in NX individuals. More strikingly, we were not able to observe such an inflammatory pattern in hyperlipidemic patients with xanthoma (familial hypercholesterolemia) or in individuals with MIg without xanthoma. Comparison of our findings with a recent study measuring a large number of cytokines and chemokines in serum from Erdheim-Chester patients ¹⁹, a rare non-Langerhans cell histiocytosis, further highlights the specificity of the inflammatory pattern of NX and NXG patients described in our study.

The marked elevation of circulating levels of adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) and the chemokine MCP-1 together with the presence of positive CD163 staining in cutaneous lesions in NX and NXG patients were coherent with the hypothesis of an increased susceptibility for migration and potential recruitment of leukocytes in inflammatory sites. Analysis of circulating subsets of monocytes further highlights major pathophysiological differences observed between the two types of diseases with a reduction of the number of non-inflammatory classical monocytes in NXG, but not in NX, whereas that of pro-inflammatory non-classical monocytes was diminished in NX but not in NXG. Such a difference in monocyte subsets between NX and NXG patients may provide clues to explain the more pronounced cutaneous inflammation observed in NXG subjects. Then, analysis of the specific contribution of those monocyte subsets in xanthoma associated with MIg might

help in the complete understanding of the pathophysiological mechanisms involved in those diseases.

Moreover, we observed that the number of circulating plasmacytoid DC (pDC) was found reduced in NX and NXG patients, arguing for an increased cutaneous recruitment of this DC cell population as observed in psoriasis, another inflammatory skin disease ²⁰. In atopic dermatitis (AD), a pruritic chronic inflammatory skin disorder, distribution of blood DC subsets determined by the measure of the mDC/pDC ratio was reported to dictate the allergic status of AD patients ²¹. In the present study, we were able to extend the analysis of mDCs by distinguishing both mDC1 and mDC2 subsets which clearly reinforce the characterization of the inflammatory status of NXG and NX patients. Similarly to human blood plasmacytoid DC (pDC), both myeloid subsets (mDC1 and mDC2) were reported to be present in the skin ²². Interestingly, mDC1/pDC ratio was increased in both NXG and NX subjects whereas mDC2/pDC ratio was found reduced, an observation coherent with proposed pro-inflammatory properties of the mDC1 subset ^{23,24} and that would be in favour of a tolerogenic role of the mDC2 subset. Coherent with this assertion, a high mDC/pDC ratio was proposed to be positively correlated to the Th1/Th2 ratio in AD ²¹. In addition, activation of inflammatory mDCs in AD led to a marked secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN γ , IL-8, TNF α and MIP-1 α ²⁵; circulating levels of those cytokines were, or tended to be, increased in plasmas from both NX and NXG patients. Similarly to our observation in NX and NXG, levels of pDC and mDC2 were reduced in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome, a chronic inflammatory autoimmune disease ²⁶. Finally, the key role of DC in controlling immune response in normolipidemic xanthoma associated to MIg was revealed by treatment of a NXG patient with IvIg, which led to a major improvement of clinical symptoms concomitant to a complete restoration of numbers of circulating DC subsets. Indeed, mDC1/pDC, mDC2/pDC and mDC1/mDC2 ratios as well as the pro-

inflammatory pattern of the NXG patient were normalized following a 12-weeks IvIg therapy. Our findings were consistent with previous studies that reported a modulation of maturation and function of DC upon IvIg ^{27, 28}, although the DC subsets as well as mechanism of action involved in those effects are still poorly understood. So far, no efficient therapeutic strategy was identified to cure normolipidemic xanthoma associated to MIg ³ and IvIg was recently proposed as being the most promising option in NXG ⁸. The present study clearly strengthens the notion that IvIg likely represents an efficient therapeutic approach to treat NXG and potentially normolipidemic xanthoma associated to MIg, however further clinical investigations are needed to confirm the beneficial effect of IvIg in those pathologies. Notably, we observed that plasma lipidemia was significantly increased in the NXG patient upon IvIg and then might represent a limitation in the use of this therapy. Such an elevation of plasma lipid levels could result from the marked reduction of circulating levels of IL-6 observed following IvIg. Indeed, treatment of rheumatoid arthritis patients with tocilizumab, a humanized IL-6 receptor-inhibiting monoclonal antibody, led to a pronounced increase of plasma lipid levels ²⁹.

Because cases of NX and NXG are very rare, only sporadic descriptions of clinical and biological aspects of those pathologies were reported so far in the literature. The present study therefore constitutes the most complete characterization of NX and NXG patients described to date and provides new important information in the understanding of cellular mechanisms involved in normolipidemic xanthoma associated to MIg.

References.

1. Parker F. Normocholesterolemic xanthomatosis. *Arch Dermatol.* 1986;122:1253-1257.
2. Spicknall KE, Mehregan DA. Necrobiotic xanthogranuloma. *Int J Dermatol.* 2009;48:1-10.
3. Szalat R, Arnulf B, Karlin L, Rybojad M, Asli B, Malphettes M, Galicier L, Vignon-Pennamen MD, Harel S, Cordoliani F, Fuzibet JG, Oksenhendler E, Clauvel JP, Brouet JC, Feraud JP. Pathogenesis and treatment of xanthomatosis associated with monoclonal gammopathy. *Blood.* 2011;118:3777-3784.
4. Jeziorska M, Hassan A, Mackness MI, Woolley DE, Tullo AB, Lucas GS, Durrington PN. Clinical, biochemical, and immunohistochemical features of necrobiotic xanthogranulomatosis. *J Clin Pathol.* 2003;56:64-68.
5. Matsuura F, Yamashita S, Hirano K, Ishigami M, Hiraoka H, Tamura R, Nakagawa T, Nishida M, Sakai N, Nakamura T, Nozaki S, Funahashi T, Matsumoto C, Higashiyama M, Yoshikawa K, Matsuzawa Y. Activation of monocytes in vivo causes intracellular accumulation of lipoprotein-derived lipids and marked hypocholesterolemia--a possible pathogenesis of necrobiotic xanthogranuloma. *Atherosclerosis.* 1999;142:355-365.
6. Ugurlu S, Bartley GB, Gibson LE. Necrobiotic xanthogranuloma: long-term outcome of ocular and systemic involvement. *Am J Ophthalmol.* 2000;129:651-657.
7. Wood AJ, Wagner MV, Abbott JJ, Gibson LE. Necrobiotic xanthogranuloma: a review of 17 cases with emphasis on clinical and pathologic correlation. *Arch Dermatol.* 2009;145:279-284.
8. Hallermann C, Tittelbach J, Norgauer J, Ziemer M. Successful treatment of necrobiotic xanthogranuloma with intravenous immunoglobulin. *Arch Dermatol.* 2010;146:957-960.
9. Guerin M, Lassel TS, Le Goff W, Farnier M, Chapman MJ. Action of atorvastatin in combined hyperlipidemia: preferential reduction of cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL1 particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:189-197.
10. Le Goff W, Settle M, Greene DJ, Morton RE, Smith JD. Reevaluation of the role of the multidrug-resistant P-glycoprotein in cellular cholesterol homeostasis. *J Lipid Res.* 2006;47:51-58.
11. Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W. Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J Biol Chem.* 2011;286:30926-30936.
12. Van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol.* 2010;47:1650-1660.
13. Ghosh S. Macrophage cholesterol homeostasis and metabolic diseases: critical role of cholesteryl ester mobilization. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2011;9:329-340.
14. Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol.* 2005;17:273-283.
15. Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation.* 2006;113:2548-2555.
16. Meurs I, Van Eck M, Van Berkel TJ. High-density lipoprotein: key molecule in cholesterol efflux and the prevention of atherosclerosis. *Curr Pharm Des.* 2010;16:1445-1467.
17. Chapman MJ, Bruckert E. The atherogenic role of triglycerides and small, dense low density lipoproteins: impact of ciprofibrate therapy. *Atherosclerosis.* 1996;124 Suppl:S21-28.

18. Feingold KR, Castro GR, Ishikawa Y, Fielding PE, Fielding CJ. Cutaneous xanthoma in association with paraproteinemia in the absence of hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1989;83:796-802.
19. Arnaud L, Gorochov G, Charlotte F, Lvovschi V, Parizot C, Larsen M, Ghillani-Dalbin P, Hervier B, Kahn JE, Deback C, Musset L, Amoura Z, Haroche J. Systemic perturbation of cytokine and chemokine networks in Erdheim-Chester disease: a single-center series of 37 patients. *Blood.* 2011;117:2783-2790.
20. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med.* 2005;202:135-143.
21. Hashizume H, Horibe T, Yagi H, Seo N, Takigawa M. Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmacytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *J Immunol.* 2005;174:2396-2403.
22. Narbutt J, Lesiak A, Sysa-Jedrzejowska A, Smolewski P, Robak T, Zalewska A. The number and distribution of blood dendritic cells in the epidermis and dermis of healthy human subjects. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:61-63.
23. Johnson TR, Johnson CN, Corbett KS, Edwards GC, Graham BS. Primary human mDC1, mDC2, and pDC dendritic cells are differentially infected and activated by respiratory syncytial virus. *PLoS One.* 2011;6:e16458.
24. Noessner E, Lindenmeyer M, Nelson PJ, Segerer S. Dendritic Cells in Human Renal Inflammation - Part II. *Nephron Exp Nephrol.* 2011;119:e91-98.
25. Novak N, Bieber T. The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53:S171-176.
26. Vogelsang P, Brun JG, Oijordsbakken G, Skarstein K, Jonsson R, Appel S. Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1235-1238.
27. Tha-In T, Metselaar HJ, Tilanus HW, Groothuismink ZM, Kuipers EJ, de Man RA, Kwekkeboom J. Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells. *Blood.* 2007;110:3253-3262.
28. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, Misra N, Donkova V, Pashov A, Chevaillier A, Mouthon L, Weill B, Bruneval P, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood.* 2003;101:758-765.
29. Kawashiri SY, Kawakami A, Yamasaki S, Imazato T, Iwamoto N, Fujikawa K, Aramaki T, Tamai M, Nakamura H, Ida H, Origuchi T, Ueki Y, Eguchi K. Effects of the anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2011;31:451-456.

Figure Legends.

Figure 1. Impaired macrophage lipid homeostasis in NXG and NX patients. (A) Human monocyte-derived macrophages (HMDM) were incubated for 48 hours with serum from normolipidemic individuals (Ctrl, n=4), control MIg subjects (n=4), NX (n=2) or NXG patients (n=2). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.0005$ versus Ctrl sera. (B) Cellular cholesterol content in HMDM isolated from either a control individual (C) or the NXG2 patient (N) incubated with auto/heterologous serum or with serum from a subject displaying Familial Hypercholesterolemia (FH). * $p < 0.05$ versus Control HMDM incubated with autologous serum. (C) Recognition of lipoprotein associated antigens by ELISA in NXG patients. Results are expressed as fold increase to control plasma (n = 5). (D) Free [^3H]cholesterol efflux from human THP-1 macrophages to control (Ctrl, n=4), NXG (n=6) or NX (n=8) sera. * $p < 0.05$ versus Ctrl sera. (E) Plasma lipoprotein profile from control (Ctrl, n=3), NX (n=4) and NXG (n=3) patients determined by isopycnic density gradient ultracentrifugation. (F) Analysis of HDL subfraction capacity isolated from control (Ctrl, n=3), NX (n=4) and NXG (n=3) plasma to promote free [^3H]cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. ** $p < 0.005$ versus Ctrl HDL subfraction.

Figure 2. NX and NXG patients exhibit a unique inflammatory pattern. Circulating levels of cytokines, soluble receptors and adhesion molecules were quantified in plasma from control (Ctrl, n=20, open bars), NX (n=8, closed bars), NXG (n=7, hatched bars) and FH (n=8, crossed bars) individuals on a semi-automated Biochip Array analyzer (Randox). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ versus Ctrl plasma.

Figure 3. Imbalance in blood dendritic cell subsets in NX and NXG patients. Absolute counting of blood (A) CD45-positive leukocytes, (B) T lymphocyte subsets (Thelper, Th: CD3⁺ CD4⁺; naïve Th: CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127⁺; T-regulatory cells, Treg: CD3⁺ CD4⁺ CD25^{hi} CD127^{neg}), (C) dendritic cell subsets (plasmacytoid DC, pDC: CD11c^{neg} CD123⁺ BDCA2⁺; myeloid DC1, mDC1: CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{neg}; myeloid DC2, mDC2: CD11c⁺ BDCA1^{neg} BDCA3⁺) and (D-E) dendritic cell subsets ratio were determined by flow cytometry (LSR II Fortessa Sorp, BD Biosciences) in control (Ctrl, n=7, open bars), NXG (n=4, dark bars) and NX (n=5, grey bars) subjects. * p<0.05 and ** p<0.005 versus Ctrl individuals.

Figure 4. Modulation of plasma cytokine levels in the NXG2 patient upon IvIg therapy. Circulating levels of cytokines and soluble receptors were quantified in plasma from the NXG2 patient treated with IvIg infusions every 3 weeks at the dose of 2g/kg on a semi-automated Biochip Array analyzer (Randox). Blood samples were collected before the first IvIg dose (D0) and every 3 weeks prior to the next IvIg dose (D1-4). *p<0.05 versus D0.

Figure 5. Plasma lipid levels in the NXG2 patient upon IvIg therapy. Plasma lipid levels were quantified with an Autoanalyzer (Konelab 20) in plasma from the NXG2 patient treated with IvIg infusions every 3 weeks at the dose of 2g/kg. Blood samples were collected before the first IvIg dose (D0) and every 3 weeks prior to the next IvIg dose (D1-4). *p<0.05 versus D0.

Figure 6. Restoration of dendritic cell subsets ratios in the NXG2 patient by IvIg. Counting of dendritic cell subsets (plasmacytoid DC, pDC: CD11c^{neg} CD123⁺ BDCA2⁺; myeloid DC1, mDC1: CD11c⁺ BDCA1⁺ BDCA3^{neg}; myeloid DC2, mDC2: CD11c⁺

BDCA1^{neg} BDCA3⁺) by flow cytometry (LSR II Fortessa Srp, BD Biosciences) in blood samples from the NXG2 patient treated with IvIg infusions every 3 weeks at the dose of 2g/kg. Blood samples were collected before the first IvIg dose (D0) and 3 weeks following the fourth IvIg dose (D4).

Supplemental Figure Legends.

Supplemental Figure I. Increased cholesterol content in human macrophages incubated with NX and NXG sera. Cellular cholesterol content in human THP-1 macrophages incubated for 48 hours with serum from normolipidemic individuals (Ctrl, n=3), NX (n=8) or NXG patients (n=5).

Supplemental Figure II. Blood lymphocyte subsets and neutrophils in NXG and NX patients. Absolute counting of blood (A) T lymphocyte subsets (Cytotoxic T lymphocytes, CTL: CD3⁺ CD8⁺; B lymphocytes, LB: CD3^{neg} CD19⁺; natural killer cells, NK: CD3^{neg} CD56⁺ and NKT: CD3⁺ CD16⁺) and (B) CD45-positive neutrophils by flow cytometry (LSR II Fortessa Sorp, BD Biosciences) in control (Ctrl, n=7, open bars), NXG (n=4, dark bars) and NX (n=5, grey bars) subjects. * p<0.05 versus Ctrl individuals.

Supplemental Figure III. Blood monocyte subsets in NXG and NX patients. Counting of monocyte subsets (classical: 14⁺⁺/16⁻/CCR2^{hi}, intermediate: 14⁺⁺/16⁺⁺ and non classical: 14^{dim}/16⁺⁺/CX3CR1^{hi}) by flow cytometry (LSR II Fortessa Sorp, BD Biosciences) in blood samples from the NXG2 patient treated with IvIg infusions every 3 weeks at the dose of 2g/kg. Blood samples were collected before the first IvIg dose (D0) and 3 weeks following the fourth IvIg dose (D4).

Acknowledgments.

We are indebted to Dr. J. Lamont (Randox Laboratories) for the kind gift of cytokine biochips. J.P., M.O. and E.V. were recipients of a Research Fellowship from the French Ministry of Research and Technology. This work was supported by INSERM and the Fondation de France.

	NX (n=8)	NXG (n=6)	Controls (n=6)	<i>P</i> NX vs Ctrl	<i>P</i> NXG vs Ctrl
Gender	5M / 3F	2M / 4F	3M / 3F		
Age (year)	62 ± 13.7	66 ± 2.5	63 ± 10		
Total Cholesterol (mg/dL)	192.6 ± 19.3	147.9 ± 47.5	203.6 ± 29.3	0.985	0.164
Free Cholesterol (mg/dL)	60.2 ± 12.8	40.9 ± 16.3	58.3 ± 10.0	0.961	0.147
Triglycerides (mg/dL)	136.2 ± 90.7	96.9 ± 55.2	94.0 ± 16.0	0.415	0.381
Apolipoprotein B (mg/dL)	0.97 ± 0.14	0.70 ± 0.24	1.01 ± 0.23	0.262	0.755
LDL-Cholesterol (g/L)	127.4 ± 14.5	88.1 ± 35.3	130.9 ± 32.0	0.168	0.450
Apolipoprotein A-I (g/L)	1.14 ± 0.18	1.18 ± 0.34	1.55 ± 0.06	0.001	0.114
Apolipoprotein A-II (g/L)	0.20 ± 0.05	0.14 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.003	0.002
Apolipoprotein E (mg/dL)	4.98 ± 3.28	1.71 ± 1.10	4.64 ± 1.22	0.878	0.019
HDL-Cholesterol (mg/dL)	38.0 ± 16.0	37.7 ± 22.4	54.6 ± 4.4	0.027	0.013
CRP (mg/L)	5.8 ± 5.5	9.7 ± 7.8	0.14 ± 0.02	0.188	0.070

Table 1: Plasma lipid parameters and CRP values in NX and NXG patients.

Patients														
	NX1	NX2	NX3	NX4	NX5	NX6	NX7	NX8	NXG1	NXG2	NXG3	NXG4	NXG5	NXG6
Gender	M	F	F	M	M	M	M	F	M	F	F	F	F	M
Age (year)	75	37	74	52	42	68	66	82	68	69	65	68	65	60
Lesion topography	Trunk, palpebral, diffuse	Diffuse xanthoderma	Trunk, peri-palpebral	Trunk, folds	Trunk, folds	Trunk, folds	Diffuse xanthoderma	Trunk	Multiple Skin lesions	Multiple skin lesions	Peri-Orbital	Trunk	Trunk	Retro-Orbital mass + Peri-Orbital
Monoclonal isotype	IgG _L	IgG _K	IgG _K	IgG _L	IgG _L	IgG _K	IgG _L	IgG _L	IgG _λ	IgG _K	IgG _K	IgG _K	IgG _λ	IgG _λ
CV events	None	None	None	None	None	Severe atherosclerosis/ ischemic cardiopathy/ stroke	None	None	Carotid dissection/ Ischemic cardiopathy	None	None	None	None	None
Total Cholesterol (mg/dL)	173.4	170.9	257.8	203.1	193.8	182.3	166.9	192.9	157.0	170.2	174.2	170.4	5.5	209.8
Free Cholesterol (mg/dL)	54.1	50.1	105.0	59.5	nd	52.2	48.1	52.3	44.7	47.3	53.2	nd	0.00	59.1
Triglycerides (mg/dL)	68.5	81.7	470.5	165.0	60.0	58.3	91.8	94.2	160.8	66.4	152.4	143.2	10.4	48.4
ApoB (mg/dL)	0.99	1.00	1.27	1.11	0.77	0.72	0.86	1.04	0.88	0.68	0.76	1.00	0.00	0.89
LDL-Cholesterol (g/L)	134.7	134.5	140.7	150.1	113.8	106.7	103.5	135	102.8	90.0	nd	113.8	0.00	134.1
ApoA-I (g/L)	0.93	0.94	1.21	0.87	1.30	1.49	1.29	1.08	1.56	1.42	1.56	1.12	0.22	1.21
ApoA-II (g/L)	0.15	0.20	0.10	0.14	0.19	0.25	0.33	0.22	0.11	0.16	nd	0.25	0.05	0.14
ApoE (mg/dL)	1.82	4.20	17.82	5.26	2.08	2.29	2.31	4.02	1.60	0.78	nd	1.98	0.00	4.18
HDL-Cholesterol (mg/dL)	25.0	20.0	23.0	20.0	68.0	64.0	45.0	39.0	22.0	64.0	nd	28.0	5.0	66.0
CRP (mg/L)	2.6	2.0	10.7	3.1	0.4	22.7	2.3	2.4	30.0	3.00	10.0	1.00	12.5	1.80

Supplemental Table I. Clinical and plasma lipid parameters in NX and NXG patients. nd: non determined

Monocytes	Patients										Controls n=7	p NX vs Ctrl	p NXG vs Ctrl
	NX1	NX4	NX5	NX6	NX7	NXG2	NXG6	NXG7	Pool NX n=5	Pool NXG n=3			
Classical (Cls) CD14++/CD16-	106960	399261	162061	216127	363340	129647	70879	147979	249550 ± 105401	116168 ± 30193	303359 ± 10837	0.476	0.036
Intermediate (int) CD14++/CD16+	881	25839	6050	3188	3867	7455	6165	24546	7965 ± 7150	12723 ± 7882	16468 ± 4984	0.111	0.507
Non Classical (non cls) CD14dim/CD16++	37	43926	6105	3439	1566	26704	1518	13647	11015 ± 13164	13956 ± 8499	32749 ± 10203	0.032	0.053
Int / Cls	0.008	0.065	0.037	0.015	0.011	0.058	0.087	0.166	0.027 ± 0.019	0.104 ± 0.042	0.059 ± 0.016	0.033	0.084
Non cls / cls	0.0004	0.110	0.038	0.016	0.004	0.206	0.021	0.092	0.034 ± 0.032	0.106 ± 0.066	0.123 ± 0.046	0.025	0.750
Non cls / int	0.040	1.700	1.00	1.100	0.400	3.600	0.200	0.600	0.848 ± 0.502	1.452 ± 1.432	2.043 ± 0.478	0.007	0.443

Supplemental Figure II. Absolute quantification of classical (CD14⁺⁺/CD16^{neg}), intermediary (CD14⁺⁺/CD16⁺) and non classical (CD14^{dim}/CD16⁺⁺) monocytes by flow cytometry (LSR II Fortessa Sorp, BD Biosciences) in NX and NXG patients.

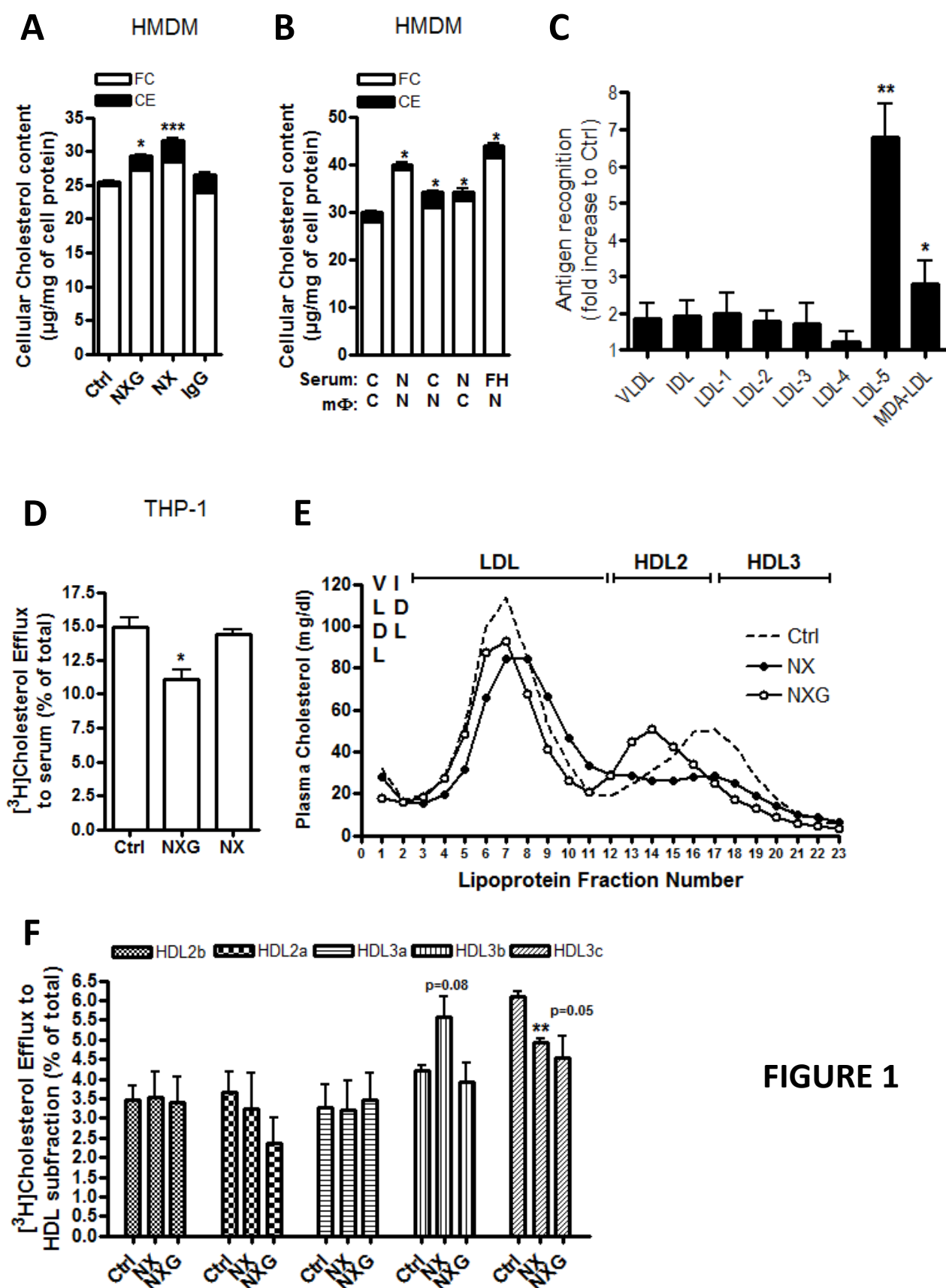


FIGURE 1

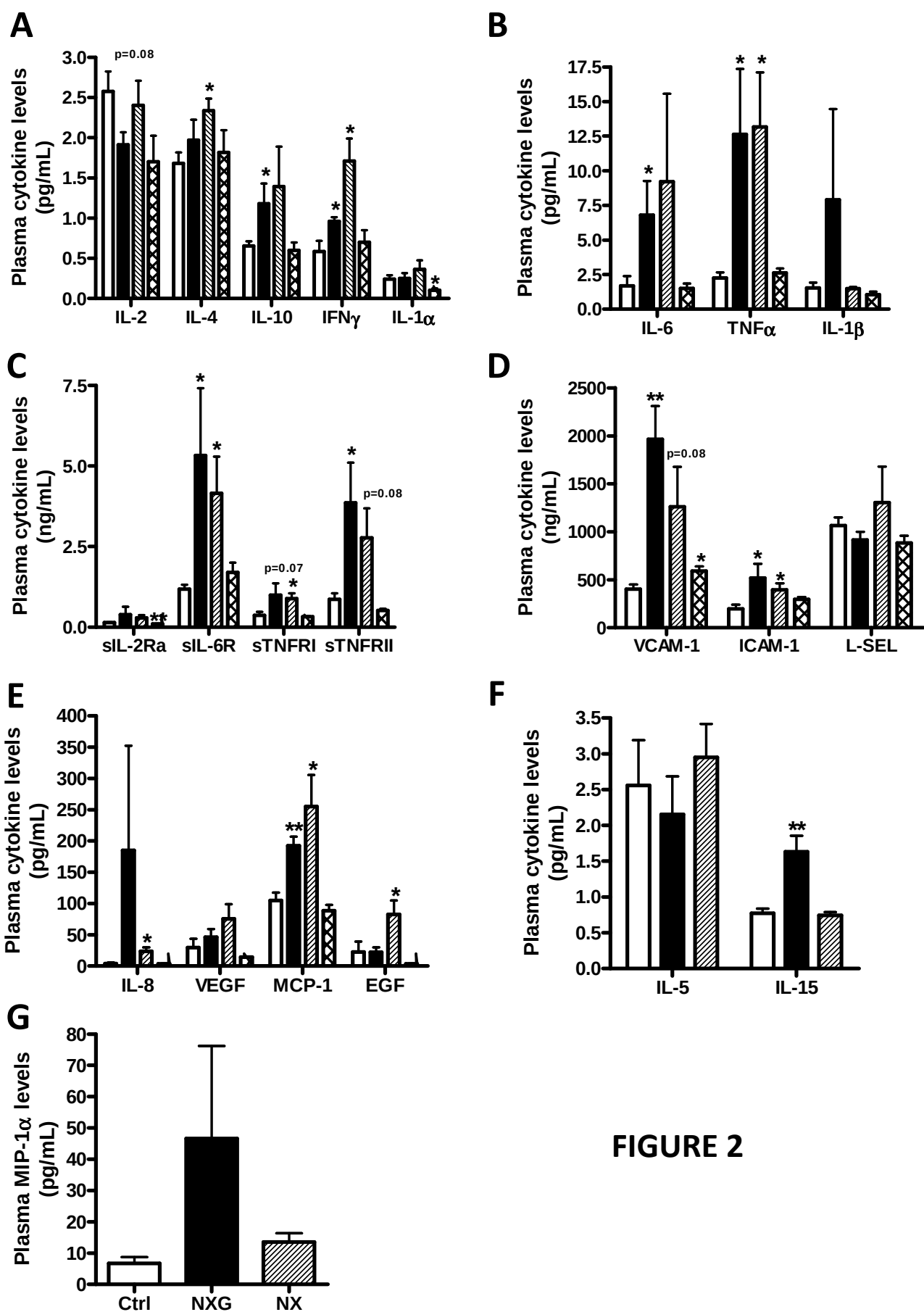


FIGURE 2

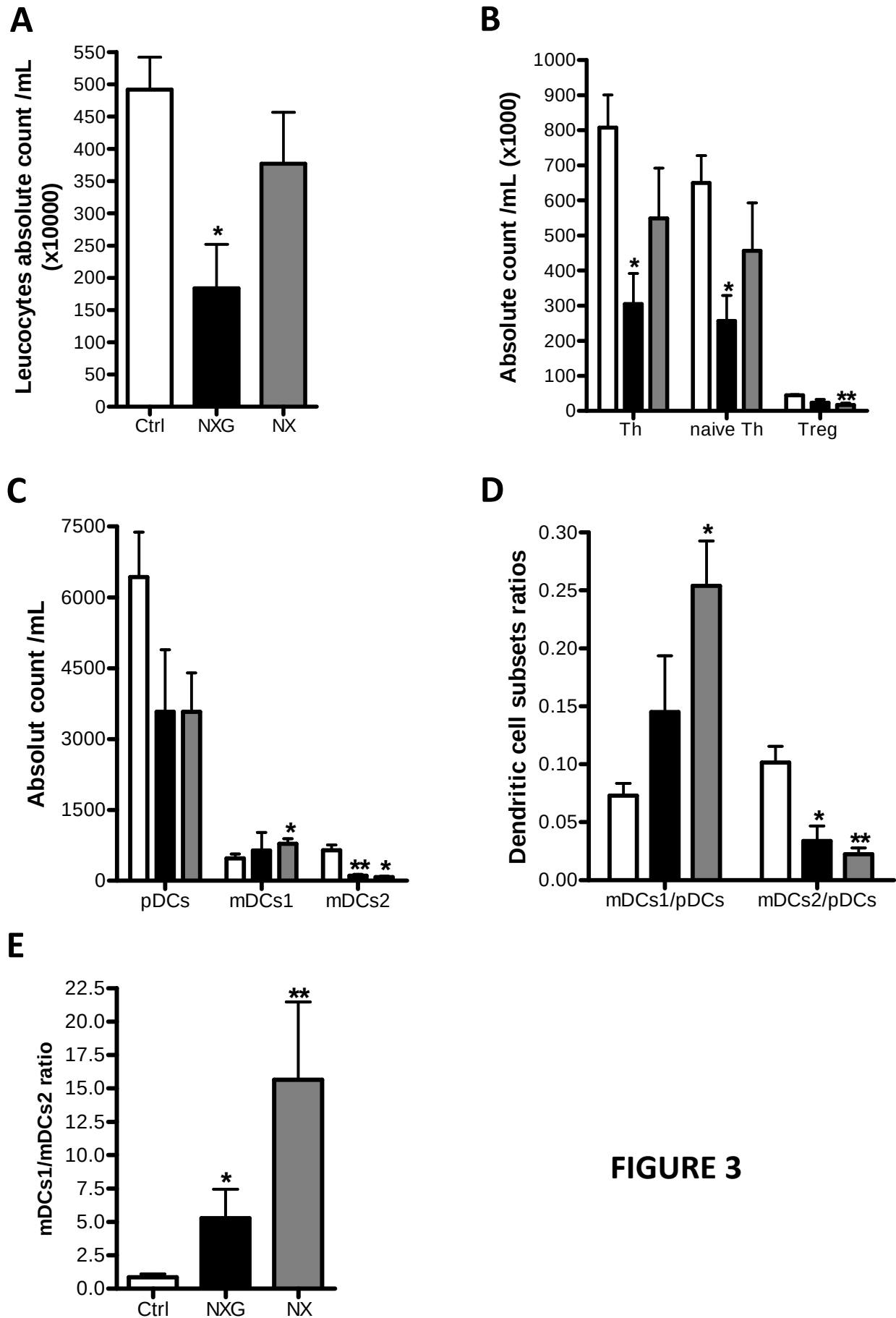


FIGURE 3

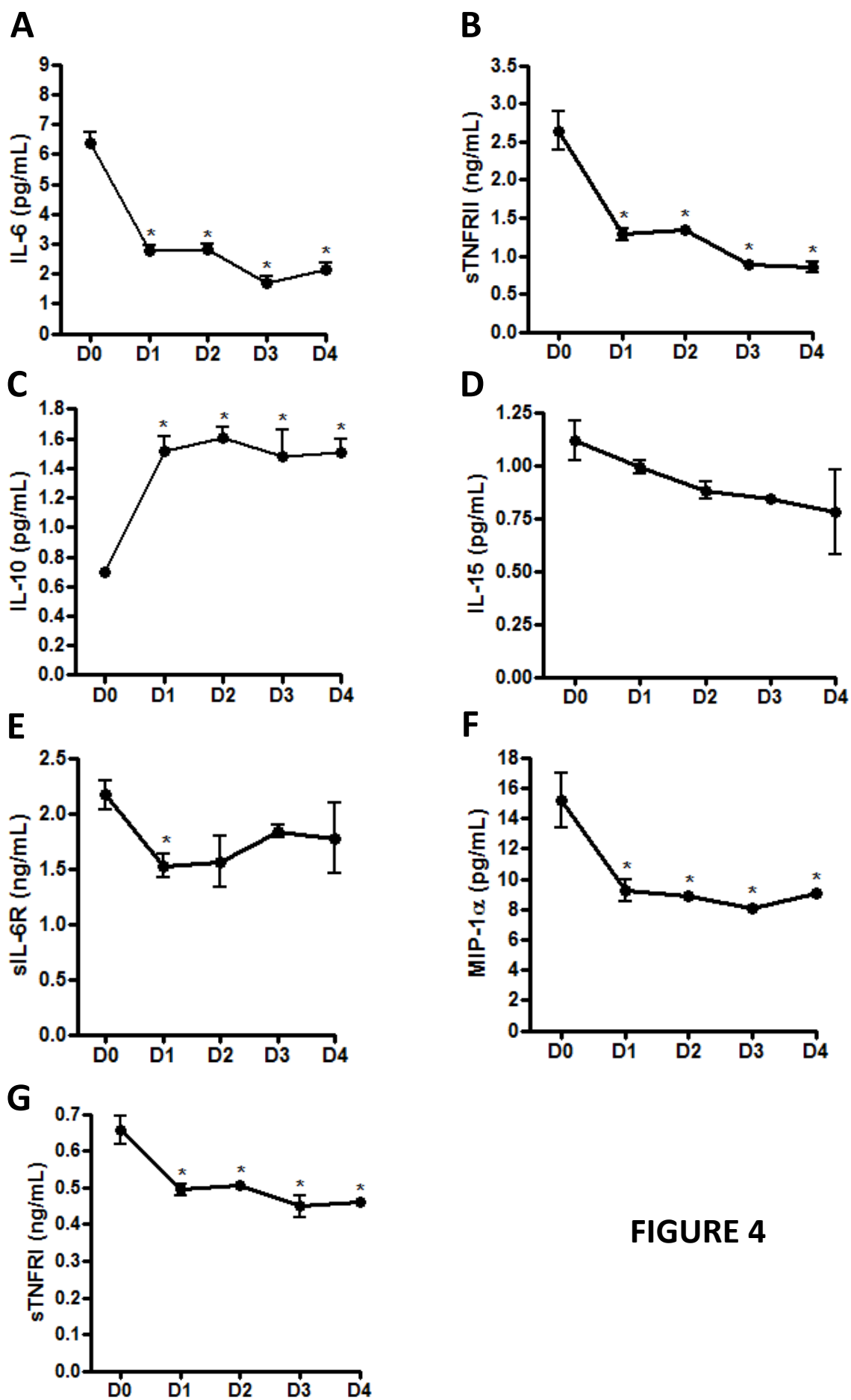


FIGURE 4

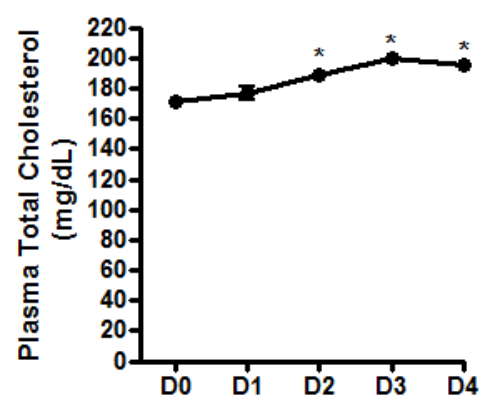
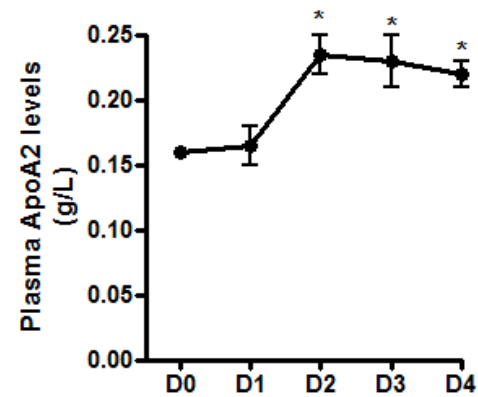
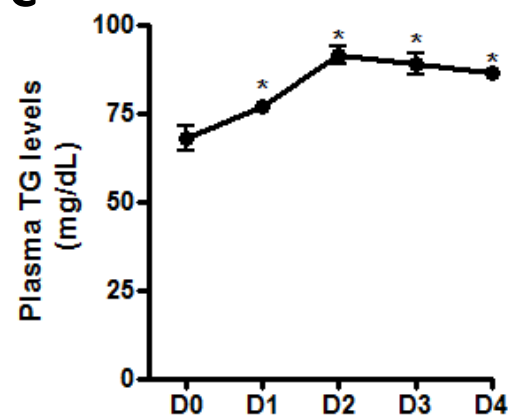
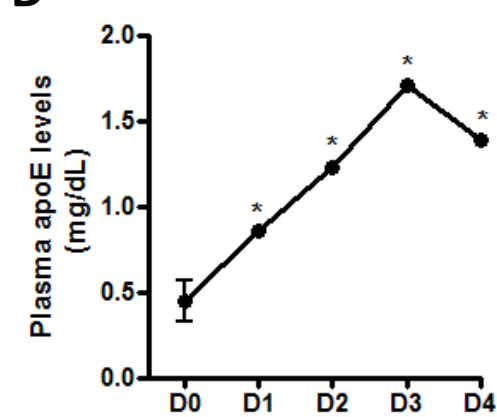
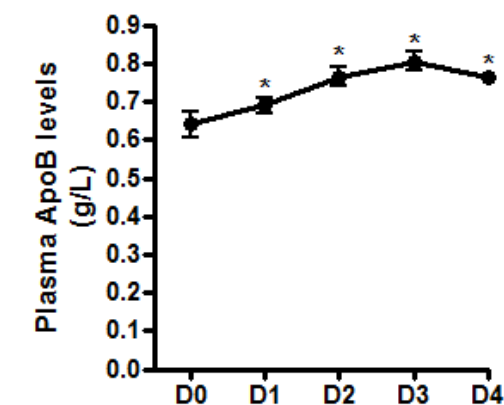
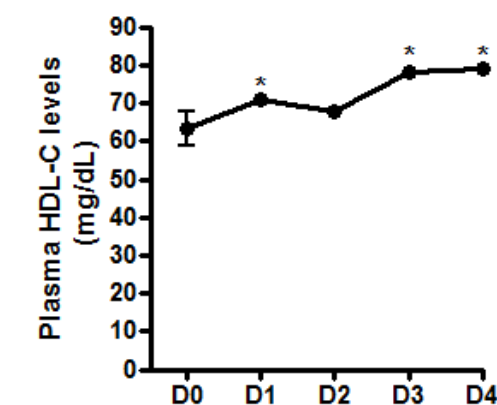
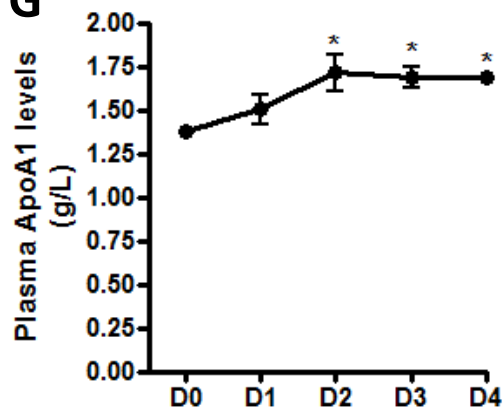
A**B****C****D****E****F****G****FIGURE 5**

FIGURE 6

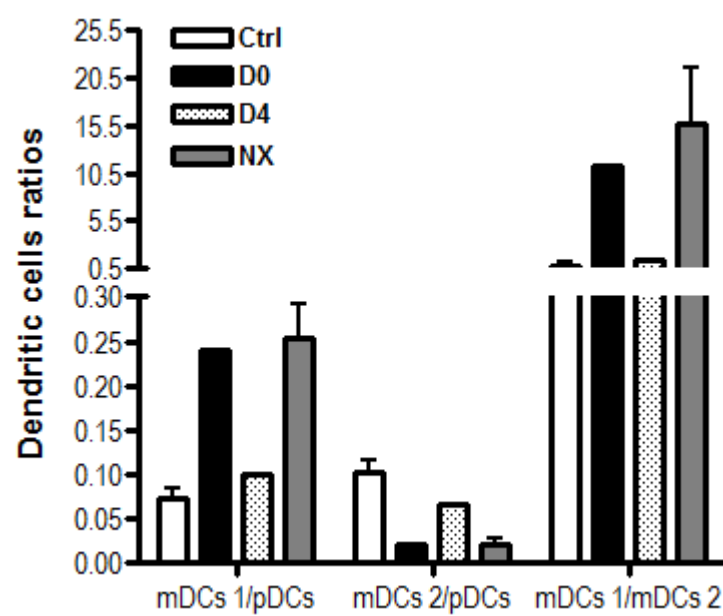


FIGURE I

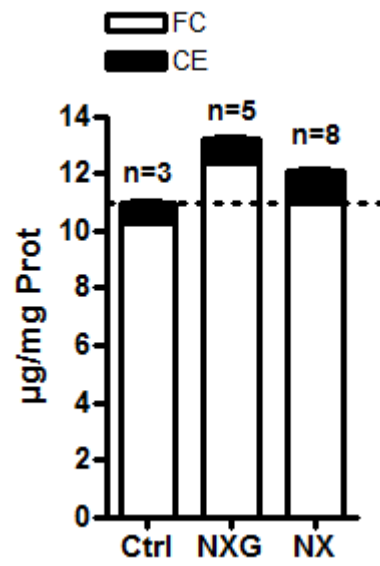
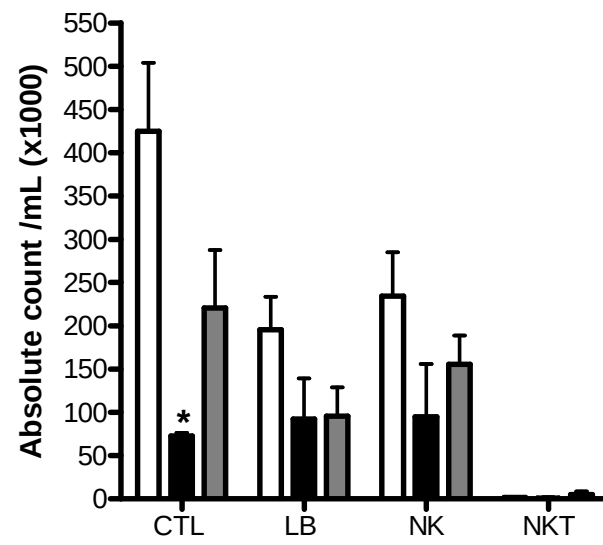


FIGURE II

A



B

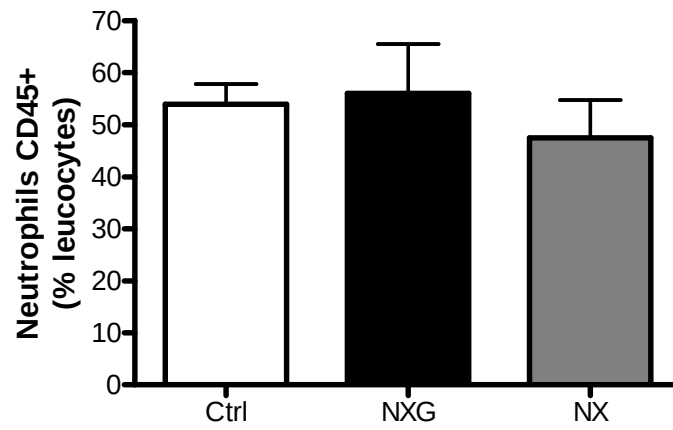
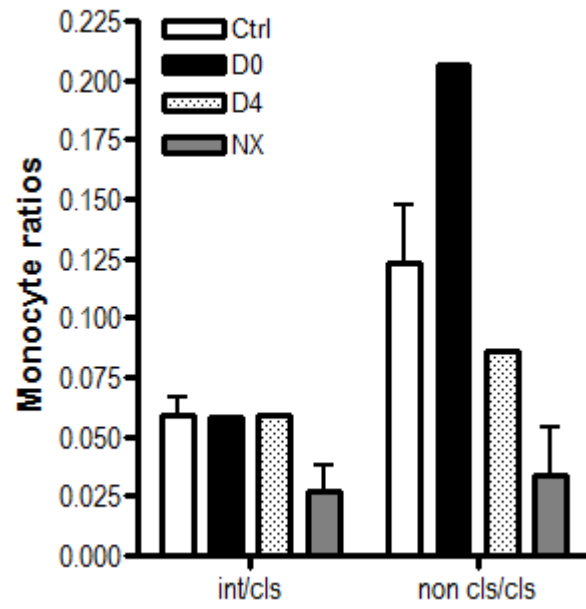
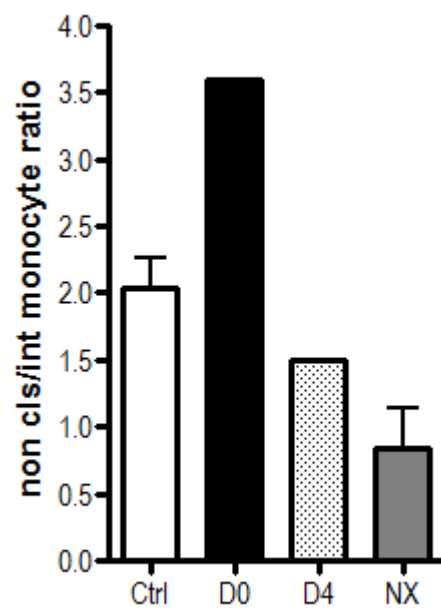


FIGURE III

A



B



Discussion générale

Nous montrons donc que les phagocytes mononucléés qui sont souvent considérés comme responsables de l'initiation ou de la progression de certaines maladies inflammatoires chroniques représentent en réalité des populations cellulaires hétérogènes qui ont des propriétés et des fonctions différentes. Ainsi, la modulation d'une sous population préférentielle par rapport à une autre permet de modifier l'environnement et les fonctions cellulaires impliquées dans les pathologies.

1. Discussion sur la survie des macrophages dans l'athérosclérose murine.

L'athérosclérose est à l'origine considérée comme une maladie du métabolisme lipidique où le facteur de risque majeur est une hypercholestérolémie associée à de fort taux de LDL. Les avancées scientifiques des dernières années sur les mécanismes d'initiation et de progression de la pathologie impliquent principalement le système immunitaire définissant ainsi l'athérosclérose comme une maladie inflammatoire chronique associée à des dyslipidémies.

Initialement, le système immunitaire inné était considéré comme athérogène puisque les cellules qui le composent sont retrouvées au sein de lésions sous forme de cellules spumeuses ou bien de corps apoptotiques voir nécrotiques.

Aujourd'hui, grâce à une meilleure caractérisation des différentes sous populations impliquées, cette notion est revue.

En effet, dans notre laboratoire nous montrons que la modification de la sensibilité des cellules du système immunitaire inné face à l'apoptose peut avoir des répercussions protectrices ou athérogènes sur la maladie (annexe 2) (annexe 3) ⁴⁴. Précédemment, nous montrons que la survie des macrophages est associée à une réduction du développement des lésions ⁴⁴. Mes travaux explorent dans des souris hypercholestérolémiques LDLr^{KO} ou

Apoe^{KO}, les mécanismes sous-jacents à la réduction de plaques préétablies lorsque les macrophages sont génétiquement modifiés pour résister à l'apoptose.

a. Impact thérapeutique sur des lésions préétablies.

Après l'observation d'une protection contre le développement de plaques d'athérome avancées dans des souris Apoe^{KO} possédant des macrophages résistants à l'apoptose, nous avons voulu déterminer le potentiel thérapeutique de cette résistance sur des plaques préétablies puisque l'athérosclérose est une maladie évolutive qui n'aboutit aux complications connues qu'après plusieurs décennies d'évolution infra-cliniques.

Ainsi, mes travaux sont réalisés sur des souris hypercholestérolémiques soit LDLr^{KO} soit Apoe^{KO}. J'ai laissé se développer les plaques dans ces animaux pour ensuite les irradier puis les transplanter avec de la moelle osseuse de souris donneuses présentant une survie des macrophages (Mø-hBcl2 C57BL/6 ou Mø-hBcl2 Apoe^{KO}) ou bien de leur contrôles associées (C57BL/6 ou Apoe^{KO}). Après une période de repeuplement cellulaire, les souris ont été sacrifiées pour analyses.

On retrouve une diminution de la taille des lésions au niveau du sinus aortique lorsque les souris sont transplantées avec de la moelle osseuse Mø-hBcl2 dans les 2 fonds hypercholestérolémiques différents. La survie du macrophage, en plus d'avoir un effet protecteur sur le développement des plaques, peut donc avoir un effet thérapeutique sur des plaques préexistantes ouvrant la voie vers de nouvelles cibles pour le traitement de cette pathologie. Cependant, le contenu macrophagique ainsi que la stabilité des lésions n'ont pour le moment pas été évalués et feront l'objet d'analyses ultérieures.

Le facteur de risque majeur de l'athérosclérose étant l'hypercholestérolémie, nous avons dosé les taux plasmatiques de cholestérol total et libre dans nos animaux. On observe une association entre la réduction de la taille des plaques d'athérome et une diminution des

niveaux circulant de cholestérol. Ainsi, la survie des macrophages face à la mort cellulaire permet de réduire le risque majeur de la maladie. L'analyse des profils lipoprotéiques par FPLC sera réalisée prochainement afin de déterminer si toutes les fractions lipidiques sont réduites ou bien si seules les LDL qui sont pro-athérogènes sont touchées par cette réduction.

b. Effet de l'expression de la protéine hBcl2 sur le nombre de macrophages.

Dans notre laboratoire nous avons précédemment montré que dans ce modèle, l'expression de la protéine hBcl2 était retrouvée dans les cellules CD68 positives correspondant aux macrophages péritonéaux et spléniques. Afin de mieux caractériser l'effet de cette expression sur la demi-vie et le nombre des macrophages dans l'ensemble des organes des animaux, nous avons réalisé des quantifications par cytométrie de flux. Mes résultats révèlent une augmentation du nombre de macrophages dans la cavité péritonéale et dans la rate. Ainsi la survie apportée par l'expression de la protéine anti-apoptotique hBcl2 se traduit par une augmentation du contenu cellulaire. Néanmoins, depuis plusieurs années il est décrit que les macrophages représentent une population hétérogène. En effet, il est rapporté l'existence de macrophages produisant de l'IL-12 et qui se différencient à partir de monocytes en culture *in vitro* sous l'action de l'IFN γ . Ces macrophages sont nommés M1 ou classiquement activés, ils possèdent des propriétés inflammatoires et semblent impliqués notamment dans la reconnaissance et la destruction des tissus lésés en réponse aux infections. Une autre population est décrite, les macrophages M2 ou alternativement activés. Ces macrophages se différencient à partir de monocytes sous l'action de l'IL-4 en culture. Ils sont considérés comme non-inflammatoires et impliqués dans la réparation tissulaire^{58 233}. Certains laboratoires rapportent que cette population M2 comprend en fait les véritables M2 responsables de la réparation tissulaire et de la production de produits de la matrice

extracellulaire, mais aussi les macrophages dit régulateurs qui sont capables de produire des cytokines anti-inflammatoires telles que le TGFβ et l'IL-10. Dans nos modèles, l'augmentation des macrophages dans les organes des animaux étant associée à une protection contre l'athérosclérose, on peut supposer que le phénotype associé des macrophages est de type M2 ou régulateur^{221 226}. Basé sur l'expression de certaines protéines comme l'arginase I ou II, le mannose récepteur, l'iNOS, on peut identifier le phénotype entre M1 et M2. L'aspect fonctionnel de chaque population nécessite aussi d'être précisé. Il est rapporté d'une part que les M2 ont une capacité d'efflux de cholestérol faible avec une diminution d'expression des transporteurs ABCA1/G1, d'autre part, il est montré que ces mêmes macrophages M2 ont une capacité d'efferocytose augmentée avec une activation plus importante des PPAR qui sont connus pour promouvoir l'efflux de cholestérol⁵⁵. Une première étape pour mieux caractériser les populations impliquées dans nos modèles consistera à analyser par RT PCR quantitative l'expression des différents marqueurs de différenciation à partir des ARNm de macrophages péritonéaux. Cependant, l'absence de marqueurs spécifiques de chaque sous population²²¹ ainsi que la grande plasticité de ce type cellulaire²³⁴ font que le rôle du macrophage représente un champ d'investigation vaste pour l'avenir de la compréhension de l'athérosclérose.

c. Implication sur les monocytes sanguins. Présence d'une monocytose
Gr1^{low}.

La protection observée dans nos modèles s'accompagne d'une augmentation sanguine des monocytes Gr1^{low}. L'implication de ces cellules dans l'athérosclérose demeure controversée aujourd'hui. Certains supposent qu'ils sont anti-inflammatoires et protecteurs par une différenciation en macrophages M2²³⁸, d'autres suggèrent qu'ils patrouillent dans les vaisseaux sanguins mais que leur rôle dans les maladies inflammatoires chronique telles que

l'athérosclérose nécessite de plus amples études ^{239 240}. Dans nos travaux, les 2 hypothèses peuvent être valides. En effet, leur augmentation peut traduire un engagement vers un phénotype de macrophages non inflammatoires si l'on considère que ce type de monocyte est capable d'être recruté et de s'infiltrer dans la paroi vasculaire. D'autre part, si l'on suppose que la population des monocytes Gr1^{low} est issue d'une perte d'expression du Gr1 par les monocytes Gr1^{hi} lorsqu'ils ne sont pas recrutés, cela signifie qu'une augmentation dans la circulation de ce type cellulaire peut traduire un recrutement de monocytes Gr1^{hi} plus faible. Or il est montré qu'un défaut de recrutement des monocytes dans le cadre de l'athérosclérose aboutit à une égression des macrophages de la plaque ²⁴¹. Ainsi, la monocytose Gr1^{low} semble bien être protectrice. Cette hypothèse est confirmée par l'approche inverse où l'on augmente la sensibilité des macrophages à l'apoptose par délétion de la protéine Bcl_{xL} spécifiquement dans le macrophage. On retrouve en effet dans ce modèle une augmentation des lésions avancées associée à une monocytose Gr1^{hi} (annexe 3). Ces résultats suggèrent donc un rôle protecteur de la monocytose Gr1^{low}.

d. Les monocytes peuvent être précurseurs des CD_s conventionnelles.

Augmentation des pDCs.

Il est décrit que les monocytes peuvent lors de l'infiltration tissulaire se différencier en cellules dendritiques inflammatoires capables de produire de fortes quantités de TNF α et de NO via l'iNOS (TipDCs) ^{168 163}. Ici, la diminution des lésions est associée à une monocytose Gr1^{low} et l'augmentation d'une population particulière de CD : les cellules dendritiques plasmacytoïdes. Il est rapporté que les macrophages, les monocytes les pDCs et les cellules dendritiques conventionnelles possèdent un précurseur commun dans la moelle osseuse que l'on appelle « macrophage and dendritic cell precursor » (MDP) ^{146 178 242}. Il est donc possible que la survie et l'augmentation du nombre de macrophages dans nos modèles

agissent sur les pDCs soit via le précurseur commun, soit via une différenciation encore inconnue des monocytes Gr1^{low} en pDCs.

Les pDCs sont connues pour être responsables de maladies auto-immunes (lupus, encéphalomyélite expérimentale auto-immune) lorsqu'elles reconnaissent via les TLR 7/9 des acides nucléiques issus de la mort cellulaire et produisent ainsi des IFN de type I²⁴³. De plus, des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire sur l'augmentation de la demi-vie des CDs (CD11c-hBcl2) montrent une légère diminution du cholestérol dans des souris Apoe^{KO}. L'effet athéroprotecteur qui pourrait en résulter est malheureusement contrebalancé par une augmentation de l'inflammation Th1/Th17 (annexe 2).

Ainsi, il est surprenant que la protection dans nos modèles Mø-hBcl2 soit associée à une augmentation des pDCs puisque d'une part la protection des macrophages contre l'apoptose réduit la quantité de cellules apoptotiques qui pourraient être reconnues via les TLR7/9⁴⁴ et d'autre part puisque ces cellules sont majoritairement inflammatoires via les IFN de type I. L'explication probable est que les pDCs expriment faiblement le CD11c. Ainsi, ce type cellulaire ne serait pas impliqué dans le modèle CD11c-hBcl2. A l'inverse, il est probable que son augmentation dans le modèle Mø-hBcl2 aboutisse à une potentielle augmentation des Treg et une diminution de l'activation des lymphocytes Th puisque ces cellules sont faiblement présentatrices d'antigènes (CMH II^{low}). Cet effet permettrait alors de diminuer l'inflammation et donc de réduire l'évolution de l'athérosclérose.

e. L'impact sur l'immunité adaptative. Réduction du nombre de Th, augmentation des Treg et modulation de l'activation T.

Comme discuté dans le paragraphe précédent, l'augmentation des pDCs dans nos souris transplantées avec la moelle osseuse de donneur Mø-hBcl2 pourrait aboutir à la protection via leur capacité tolérogène. Un article récent démontre en effet que les pDCs sont capables d'être

tolérogènes dans l'athérosclérose via une diminution de l'activation et de la prolifération Th1 impliquant la voie de l'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) ¹⁹³. Ces travaux peuvent être reliés à de précédentes études sur des souris splénectomisées retransplantées ou non avec des lymphocytes T issus de la rate de souris athérosensibles Apoe^{KO}. En effet, lorsque les souris ne sont pas retransplantées les auteurs rapportent une forte augmentation de la taille des lésions comparativement aux souris ayant reçues une opération blanche. La retransplantation de splénocytes T diminue la taille des lésions jusqu'au niveau basal de souris non splénectomisées ¹¹⁷. Ces résultats montrent bien que parmi les LT, certains peuvent diminuer l'athérosclérose soit par un changement de phénotype et d'activation (Th1/Th2) soit par des aspects régulateurs comme le montre Ait-Oufella *et al* dans Nature Medicine en 2006 ¹³¹.

Dans nos souris Mø-hBcl2, nous observons une réduction du contenu en lymphocytes Th. Cette réduction du nombre de cellules peut donc être le résultat de l'augmentation des pDCs que l'on retrouve dans les 2 fonds hypercholestérolémiques. Elle peut aussi être l'effet d'une réduction de l'inflammation sérique via un changement de phénotype des macrophages M1 vers M2/Mreg entraînant une moindre activation des Th. L'analyse de cette population montre que cette réduction s'accompagne d'une augmentation des Treg (CD25^{hi} FR4⁺). Les pDCs sont décrites comme capables de favoriser le développement des Treg lorsqu'elles sont immatures et alternativement activées via une voie IDO dépendante ²⁴⁴. De même, les macrophages Mreg étant capables de produire du TGFβ, ils peuvent promouvoir la production de Treg. D'autre part, je décris une diminution de l'état d'activation des Th pour les animaux en fond hypercholestérolémique Apoe^{KO}. Ces résultats confortent l'implication tolérogène et régulatrice des pDCs dans les souris Apoe^{KO} comme le décrivent Daissormont *et al* dans leur modèle de déplétion des pDCs dans les souris LDLr^{KO}. De plus, l'analyse des populations de cellules dendritiques conventionnelles dans nos souris Apoe^{KO} transplantées Mø-hBcl2 révèle

une diminution des CD myéloïdes concordant avec une moindre présentation et donc activation des Th.

En revanche, dans notre modèle de survie des macrophages sous fond hypercholestérolémique LDLr^{KO}, les Th sont bien diminués, les Treg augmentés, mais l'état d'activation des lymphocytes T est augmenté. Dans le même temps, on observe une augmentation des CD myéloïdes. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse d'un changement de phénotype d'activation des Th passant d'un profil Th1 à un profil Th2 lorsque les macrophages résistent à l'apoptose puisque les CD myéloïdes chez la souris sont connues pour promouvoir la différenciation Th2

245 246 247 248 .

Ces données suggèrent qu'en parallèle de l'effet majeur de protection médiée par la survie des macrophages et l'augmentation des pDCs commun aux 2 fonds hypercholestérolémiques, différents mécanismes mineurs semblent être impliqués suivant si les animaux expriment l'Apoe.

f. Mécanismes auxiliaires. Réduction de l'inflammasome ou augmentation des LB1.

Ainsi, afin de mieux caractériser l'environnement inflammatoire des souris, nous avons quantifié certaines cytokines sériques. Les résultats révèlent une forte diminution de l'IL-18 et de l'IL-12 chez les souris LDLr^{KO} transplantées avec la moelle osseuse de souris Mø-hBcl2 C57BL/6. Ces deux cytokines ont un rôle important dans la mise en place de l'inflammasome notamment de NLRP3. Cette structure aboutit à l'activation de caspases et favorise donc l'apoptose cellulaire. Il est précédemment montré que l'inflammasome a un rôle important dans la promotion de l'athérosclérose. Diminuer l'IL-12 et l'IL-18 peut donc favoriser la stabilisation voir la régression des plaques²¹¹. Ces résultats coïncident avec la diminution des Th circulants, néanmoins une quantification des cytokines Th2 (IL-4, IL-13) est en cours pour

vérifier le passage d'un phénotype Th1 à Th2. On peut toutefois émettre l'hypothèse que les macrophages des souris LDLr^{KO} possèdent la protéine Apoe qui est impliquée dans le métabolisme lipidique ainsi que dans l'ensemble des mécanismes d'efferocytose. Ainsi, en augmentant le nombre de macrophages dans les souris Mø-hBcl2, on augmente indirectement la capacité de clairance via l'Apoe.

A l'inverse, dans les souris Apoe^{KO}, on ne retrouve pas de diminution des cytokines inflammatoires. L'inflammasome ne semble donc pas impliqué dans la protection chez ces souris. Comme les macrophages de ces souris ne possèdent pas l'Apoe, l'inflammation basale se trouve supérieure ce qui est traduit en terme physiopathologique par une cholestérolémie plus élevée et des lésions plus importantes. Cependant, comme le laboratoire a rapporté une augmentation des anticorps IgM T15/EO6 dans ce modèle, que ces mêmes anticorps sont produits par les lymphocytes B de type 1 majoritairement présents dans la cavité péritonéale, et que ces mêmes immunoglobulines sont associées à une protection de l'athérosclérose via une reconnaissance de la phosphorylcholine, j'ai quantifié la population des LB1 dans le péritoine de nos souris transplantées avec la moelle osseuse de souris Mø-hBcl2 ou de leurs contrôles. Les résultats révèlent que dans le fond LDLr^{KO} cette population ne varie pas. A l'inverse, dans le fond Apoe^{KO}, l'augmentation des macrophages aboutit à une augmentation des LB1 de 53%. Or d'après de récents articles, les IgM naturelles produites sont capables de fixer les cellules apoptotiques et d'augmenter l'efferocytose soit via la fixation des complexes formés avec le récepteur des parties constantes des immunoglobulines présent sur les macrophages soit via une fixation intermédiaire de la molécule du complément C1q qui pourrait être reconnue par son récepteur aussi présent sur les phagocytes mononucléés ^{143 118}.

Grâce à ces travaux, nous obtenons une meilleure connaissance des effets décrits précédemment dans ce modèle Mø-hBcl2. L'augmentation supposée pro-athérogène de la

taille des lésions précoces pourrait en réalité refléter une simple augmentation de la cellularité des macrophages à l'intérieur des plaques puisque nous montrons ici que l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 augmente le contenu macrophagique de divers organes. Il faut par ailleurs noter que cette cellularité augmentée dans les phases précoces peut être le précurseur de l'effet protecteur sur les plaques avancées. En effet, l'augmentation du contenu en macrophage ne traduit pas obligatoirement une aggravation de l'athérosclérose puisqu'il est rapporté que l'hétérogénéité des sous-types de phagocytes mononucléés entraîne une multitude de propriétés variables. Dans cette optique, nous sommes déjà en cours de caractérisation du contenu en macrophage au sein de nos lésions, de même que nous étudions la stabilité des plaques. Des expériences d'analyses sur ARNm sont prévues afin de définir si notre protection est associée à un type particulier de macrophage. Notre hypothèse étant qu'en inhibant la mort du macrophage on permettrait l'augmentation de macrophage de phénotype M2 ou régulateur.

De plus, pour caractériser une probable amélioration de l'efferocytose, dans un premier temps des expériences *in vitro* sont envisagées sur la capacité de phagocytose de corps apoptotiques par des macrophages dérivés des monocytes de nos souris. Une différenciation à partir des Gr1^{low} ou des Gr1^{hi} permettrait de plus de mieux expliquer les effets de notre monocytose. Si les expériences en cultures sont concluantes, le passage sur modèle animal en utilisant des souris transgéniques dont les monocytes sont marqués pourrait être envisagé. Induire une apoptose cellulaire dans un modèle animal est possible via l'expression du récepteur humain à la toxine diphtérique. Le croisement de ces 2 modèles animaux permettrait d'observer par fluorescence en microscopie confocale la phagocytose via les monocytes macrophages.

L'hypothèse envisagée dans le modèle Apoe^{KO} fait intervenir une efferocytose qui ne passerait pas par l'Apoe mais par une lymphocytose B1 et une production accrue d'IgM naturelle. Ces immunoglobulines sont reconnues par les phagocytes mononucléés via les

récepteur Fc ou le récepteur au C1q. Les IgM naturelles sont aussi capable de reconnaître des épitopes présent sur les cellules apoptotiques. Ainsi, l'efferocytose pourrait être augmenté par ces mécanismes. Pour exploré cette idée, des expériences de cultures entre macrophages et LB1 issus de nos souris sont envisagées, la production des IgM sera analysée ainsi que la capacité de phagocytose de corps apoptotiques. Enfin, pour comprendre les mécanismes liés à la réduction de cholestérol dans nos animaux, des expériences sur les modifications du métabolisme sont réalisables. Les possibilités sont une diminution de l'absorption de cholestérol à partir du bol alimentaire ou une meilleure excrétion dans les fecès. Ceci impliquerait alors l'intestin. Il est aussi possible que certains organes clé dans la régulation du métabolisme des lipides est la capacité de stocker le cholestérol pour le catabolisé ensuite, ceci impliquant le foie. Il est a noté que ces 2 organes possèdent de nombreux phagocytes mononucléés ce qui soutient leur possible implication dans nos modèles.

Finalement, avec ces travaux dans des modèles murins rendus athérosensibles par modifications génétiques dans lesquels nous observons l'effet que peut avoir une réduction de l'apoptose du macrophage sur des plaques préexistantes, nous montrons une protection induite par une augmentation des phagocytes mononucléés. Cette protection est associée à une diminution générale de l'inflammation impliquant différents types cellulaires. Réduire l'apoptose du macrophage se révèle donc une nouvelle cible thérapeutique potentielle. Toutefois, il faut tenir compte de la difficulté de réalisation d'un tel traitement chez l'homme, mais aussi d'intégrer les risques cancérigènes encourus lors de l'augmentation d'un type cellulaire. Il semble donc plus raisonnable de cibler non pas la réduction de l'apoptose mais l'augmentation de l'efferocytose des cellules mortes. En cela, moduler l'inflammation via les mécanismes décrits dans ces travaux semble être une cible intéressante puisqu'une réduction de celle-ci pourrait être associée à la protection. La littérature rapporte quelques tests

thérapeutiques chez l'homme dans cette voie. Des traitements basés sur l'inhibition de l'action du TNF α ou de l'IL-6 ne rapportent pas d'effets significatifs à long terme sur l'athérosclérose^{249 250 251 252}. Cependant, ces traitements ne ciblent pas les acteurs dont nous rapportons ici l'implication via la réduction de l'apoptose.

Avec ces travaux sur modèles animaux nous avons donc mis en évidence l'importance des phagocytes mononucléés dans le développement des maladies inflammatoires chroniques avec modification du métabolisme des lipides. Nous avons aussi montré que la modulation de ce système peut aboutir à une réduction de la pathologie. Afin de confirmer ces découvertes chez l'homme, nous avons eu la possibilité en collaborant avec les médecins du service d'hématologie de l'hôpital St Louis, d'étudier des patients atteints de xanthomes. Il s'agit de pathologies rares. Cette étude sur la plus grande cohorte de patients existant, représente la plus importante caractérisation de la maladie et des potentiels mécanismes associés.

2. Discussion sur l'étude d'une pathologie humaine : le xanthogranulome.

Cette pathologie se présente sous plusieurs formes, nous avons étudié les formes planes et granulomateuses nécrobiotiques qui ne sont pas associées à des hyperlipidémies.

Ces pathologies sont caractérisées par la présence de macules, papules, nodules ou plaques, de couleur jaune-orangée ou brune pour les xanthomes plans (NX) ou de lésions papulo-nodulaires, jaune-orangées ou brunâtres, avec des télangiectasies, parfois ulcérées et confluentes, localisées préférentiellement dans la région palpébrale pour les xanthogranulomes nécrobiotiques (NXG). Chez nos patients, on retrouve associé une Immunoglobuline monoclonale. L'histologie des lésions de patients NX révèle la présence d'une infiltration par des cellules spumeuses, « gorgées » de lipides, ayant des marqueurs de

différenciation macrophagique en immunohistochimie. Concernant les NXG, une association de plages de nécrose, d'histiocytes spumeux, de cellules géantes de type Touton, et de cellules inflammatoires est retrouvée²⁵³.

a. Caractérisation de l'homéostasie lipidique.

L'accumulation lipidique retrouvée au niveau de la peau, ainsi que la présence de cellules CD163⁺ dans les biopsies nous ont orientées vers l'hypothèse d'une dérégulation de l'homéostasie lipidique dans le macrophage. Ainsi, nous montrons que l'incubation de macrophages contrôles dérivés de monocytes humain avec des sérums de patients NX ou NXG aboutit à une augmentation de charge de cholestérol dans le macrophage. De même, l'incubation des macrophages des patients avec leurs propres sérums autologues montrent une augmentation de la charge en cholestérol. Ces travaux sont les premiers à utiliser les sérums autologues, de façon commune, ce type d'expérience est réalisée à partir de LDLox ce qui apporte un biais puisque cela ne correspond pas à l'environnement des cellules du patient²⁵⁴.

Les patients présentant un gammopathie monoclonale, nous avons supposé que la charge accrue de lipides dans les macrophages peut être la cause d'une reconnaissance spécifique de LDL par les immunoglobulines qui permettraient l'internalisation dans le phagocyte comme le suggère la littérature²⁵⁵. J'ai donc réalisé à partir des plasmas des patients des expériences d'ELISA dans lesquelles la fixation spécifique d'IgG sur les sous fraction de LDL est analysée. Les résultats montrent que pour les patients NX aucune fixation spécifique n'est retrouvée alors que pour les patients NXG, de façon surprenante, une reconnaissance des LDL 5 est observée. Les LDL 5 représente la sous fraction de LDL la plus athérogène et la plus sensible à l'oxydation^{256 257 258 6}.

Parallèlement à la capacité de charge de lipides, des expériences d'efflux de cholestérol depuis le macrophage vers le plasma des patients ont été réalisées. En effet, l'efflux de

cholestérol représente l'étape initiale de la voie de retour inverse du cholestérol vers le foie limitant la formation de cellules spumeuses ²⁵⁹. Un défaut d'élimination des excès de cholestérol par ce biais entrainerait la formation de cellules spumeuses. Les travaux basés sur l'efflux spécifique sur chaque sous fraction de HDL révèlent que l'efflux sur HDL3c est diminué aussi bien chez les patients NX et NXG mais que l'effet est compensé chez les patients NX par une augmentation de l'efflux sur particules HDL3b. L'homéostasie du cholestérol dans le macrophage est donc grandement altérée chez les patients NXG et les patients NX. Ces résultats expliquent donc la formation de cellules spumeuses ayant pour marqueur le CD163 spécifique des monocytes / macrophages.

b. Profils inflammatoires plasmatiques.

Or certaines pathologies telles que l'athérosclérose montrent que la présence de cellules spumeuses est associée à une inflammation chronique ²⁶⁰. Nous avons donc quantifié dans les plasmas de nos patients la présence de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi de récepteurs solubles et de molécules d'adhésions. L'analyse exhaustive de 30 médiateurs sériques chez les patients révèle une augmentation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires parmi lesquelles le TNF α , l'IFN γ , l'IL-6. Ce profil est classiquement retrouvé dans d'autres pathologies inflammatoires telles que la maladie d'Erdheim Chester ²⁶¹. De façon unique, nos résultats montrent parallèlement que les récepteurs solubles TNFRI et II, ainsi que le récepteur soluble pour l'IL-6 (IL-6R) sont augmentés aussi bien chez les patients NX que NXG. De façon inattendue, l'IL-15 n'est augmenté que chez les patients NXG alors que l'EGF à une augmentation caractéristique chez les patients NX. Cependant, ces données n'ont pas fait l'objet d'une exploration plus approfondie dans cette étude. Il est intéressant de noter qu'en plus du profil inflammatoire cytokinique, ainsi que des récepteurs solubles augmentés, les molécules d'adhésion et de recrutement ICAM-1, VCAM-1 et MCP-1 sont augmentées

dans les 2 formes de la pathologie. Ceci peut donc être la signature d'un recrutement accru de cellules immunitaires.

c. Perturbations cellulaires.

Pour approfondir nos connaissances dans cette voie, j'ai quantifié les cellules immunitaires sanguines. Dans un 1^{er} temps, nous avons montré que ces patients présentaient une diminution globale des leucocytes circulants. Alors que la proportion des neutrophiles reste identique, la quantification des différentes sous population monocytaires montre des différences. Basé sur la nouvelle nomenclature de caractérisation des monocytes (classiques $CD14^{++}/CD16^{neg}$, intermédiaires $CD14^{++}/CD16^{+}$, non classiques $CD14^{dim}/CD16^{++}$) ¹⁴⁴, nous montrons chez les patients NXG une diminution importante des monocytes classiques non-inflammatoires alors que nous rapportons une diminution des monocytes inflammatoires intermédiaires et non classiques chez les patients NX.

Parmi les autres leucocytes circulants étudiés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux CDs qui sont souvent décrites dans la littérature comme associées aux pathologies cutanées ²⁶². Par manque de biopsie de peau, nous avons décidé de travailler sur les cellules dendritiques sanguines qui peuvent refléter la composition au niveau cutané puisque ces cellules y sont présentes ²⁶³. Il est décrit la présence de plusieurs sous populations selon la présence de divers marqueurs de surface ^{264 144}. Le même profil de CD est retrouvé chez nos patients NX et NXG. On rapporte une diminution de la population des pDCs. Ces CD, en analogie avec les données sur la souris, sont connues pour être les principales cellules productrices des IFN de type I en réponse aux infections virales et bactériennes. De même, elles sont capables dans un état de repos d'induire une tolérance avec la capacité de promouvoir la réponse T-reg ^{265 266 267}. Or nos patients NXG présentent un défaut de T-reg et d'IL-2

(rapporté récemment comme promoteur de la population T-reg dans le traitement de la vascularite sous infection HCV, ainsi que dans le traitement contre le rejet de greffe)^{268 269}.

De plus, nos patients NX et NXG présentent une augmentation de la population mDC1 (BDCA-1⁺) des cellules dendritiques associée à une diminution des mDC2 (BDCA3⁺). Afin de mieux caractériser les différences entre ces populations entre nos patients et des individus contrôles, nous étudions les rapports cellulaires. Cette méthode d'analyse permet de se prémunir d'un effet d'augmentation ou de diminution globale des leucocytes et traduit plus spécifiquement l'importance d'une population face à une autre. Ainsi, nous observons que chez les sujets NX et NXG le rapport mDC1/mDC2 est plus élevé que chez nos sujets sains. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que dans notre pathologie, associée à l'inflammation sérique, les mDC1 sont pro-inflammatoires.

La littérature sur les mDC1 les décrit d'ailleurs comme inflammatoires avec la capacité de produire de l'IL-12, de l'IL-8, d'augmenter leur expression du CD40 et d'être impliquées dans la stimulation des Th^{270 267}. À l'inverse, peu de données existent sur les mDC2. Des études récentes les rapportent comme les principales cellules responsables de la présentation croisée d'antigènes extracellulaires aux lymphocytes cytotoxiques CD8⁺^{271 272 273 274}, cependant, Mittag *et al* expliquent que les mDC1 et les pDC sont aussi capables de réaliser cette fonction²⁷⁵. D'autres travaux rapportent une plus faible production de molécules inflammatoires : l'IL-8 et de CD40 par ces cellules, avec une augmentation de l'expression de TIMP-2 (un inhibiteur des métalloprotéases)²⁷⁰. Elles sont aussi décrites comme capables de produire du TGFβ molécules anti-inflammatoires impliquées dans la différenciation des T-reg²⁶⁷, et dans le cadre d'allergies, elles favorisent l'orientation de la réponse immunitaire vers un phénotype Th2²⁷⁶. L'hypothèse dans notre cas que la diminution des mDC2 soit associée à une perte de régulation de l'inflammation n'est donc pas à exclure, cette hypothèse étant soutenue par la description d'une diminution des pDC et des mDC2 chez des patients atteints

du syndrome de Sjögren ²⁷⁷. De même qu'un phénotype particulier dans les populations monocytaires différencie les patients NX et NXG, au sein des cytokines produites, nous retrouvons une augmentation de l'IL-15 uniquement dans les patients NXG. Au niveau de pathologies cutanées, l'IL-15 est décrite comme promoteur de la différenciation des monocytes vers des CD de type cellules de Langerhans²⁷⁸. Ces données pourraient expliquer alors les différences cliniques entre les 2 formes de la pathologie mais n'ont pas fait l'objet d'une exploration approfondie dans cette étude.

d. Traitement d'une patiente par IvIg.

Ainsi, cette exploration des patients NX et NXG, a permis de réaliser l'étude descriptive la plus complète sur la pathologie des xanthomes associés à une immunoglobuline monoclonale. L'association entre la présence de cette immunoglobuline et le profil inflammatoire découvert chez ces patients nous a par ailleurs orientés vers un essai de traitement à base d'injections intraveineuses d'immunoglobulines (IvIg). En effet, ce type de traitement au départ utilisé chez des patients présentant des déficiences du système immunitaire, est aujourd'hui décrit comme anti-inflammatoire lorsqu'il est prescrit à forte concentrations en Ig ²⁷⁹. De plus, une étude récente rapporte en 2010 le succès d'un traitement de 2 patients atteint de xanthomes par IvIg.

Ainsi, nous avons traité la patiente NXG2 aux IvIg avec une dose de 2g/kg/injection toutes les 3 semaines. Dès la 1^{ère} dose, la patiente rapporte une diminution des sensations de démangeaisons et brûlures associées à la pathologie. Après 12 semaines de traitements (soit 4 doses), la patiente ne présente aucune aggravation clinique, l'inflammation locale semble diminuée avec une baisse des rougeurs ainsi que de l'ulcération des lésions.

Au niveau de l'inflammation sérique, nous rapportons une diminution dans l'ensemble des médiateurs précédemment impliqués. Ainsi, l'IL-6, l'IL-15, MIP-1 α , les sTNFR I et II, le sIL-

6R sont significativement diminués. A l'inverse, l'IL-10, principale cytokine anti-inflammatoire est largement augmentée. Ces effets sont donc concordants avec les données de la littérature qui rapporte le traitement IvIg a forte concentration comme anti-inflammatoire. Nous avons dans le même temps quantifié les populations immunitaires sanguines au cours du traitement. On remarque ainsi une normalisation du rapport des monocytes non classiques / classique qui était initialement en faveur d'une inflammation. De même, l'effet important sur les CD montre une diminution des mDC1 et une augmentation des mDC2. Cet effet soutient d'autant plus notre hypothèse que dans la pathologie les mDC2 jouent un rôle de diminution de l'inflammation alors que les mDC1 sont associées à une aggravation. Enfin, l'effet sur les lipides montre une augmentation globale des HDL et de leurs lipoprotéines associées. Les expériences d'efflux devraient donc rapporté une augmentation de cette voie protectrice dans la formation des cellules spumeuses. Ceci n'est pourtant pas rapporté, une possibilité est que parallèlement à l'augmentation du HDL-C, le LDL-C est aussi augmenté n'améliorant donc pas les paramètres lipidiques de la pathologie. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui rapportent que des patients atteints d'arthrite rhumatoïde présente un taux élevé d'IL-6 associé à une baisse des paramètres lipidique. Lorsque ces patients sont traités avec le Tocilizumab, un inhibiteur du récepteur de l'IL-6, une augmentation des lipides est observée

280.

En résumé, avec cette étude, nous rapportons un exemple de pathologie inflammatoire chronique présentant des perturbations du métabolisme lipidique. Nous montrons par ailleurs que ceci est accompagné d'une implication non négligeable du système des phagocytes mononucléés. Nous précisons aussi que l'utilisation d'un traitement anti-inflammatoire permet de moduler ces populations de cellules du système immunitaire aboutissant à une amélioration clinique de la patiente.

Ces travaux de thèse mettent donc en avant l'importance de considérer le système immunitaire et plus particulièrement le système des phagocytes mononucléés dans diverses pathologies inflammatoires chroniques. Ils ont permis de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents aux modulations de ces cellules afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être associées aux traitements actuels dont les effets peuvent être limités.

Références

1. Steinberg, D. and A.M. Gotto, Preventing Coronary Artery Disease by Lowering Cholesterol Levels. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 1999. 282(21): p. 2043-2050.
2. Stary, H.C., et al., *A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis: A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1995. **15**(9): p. 1512-1531.
3. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. *Cell*, 2011. **145**(3): p. 341.
4. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis*. *The American Journal of Pathology*, 1999. **155**(1): p. 1.
5. Ross, R., *Atherosclerosis – An Inflammatory Disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **340**(2): p. 115-126.
6. Ylä-Herttuala, S., et al., *Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1989. **84**(4): p. 1086.
7. Steinberg, D., *A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 1997. **131**, **Supplement 1**(0): p. S5.
8. Lum, H. and K.A. Roebuck, *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction*. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2001. **280**(4): p. C719-C741.
9. Diaz, M.N., et al., *Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease*. *New England Journal of Medicine*, 1997. **337**(6): p. 408-416.
10. Van Eck, M., et al., *Effect of Human Scavenger Receptor Class A Overexpression in Bone Marrow-Derived Cells on Cholesterol Levels and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000. **20**(12): p. 2600-2606.
11. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. *Nature*, 1997. **386**(6622): p. 292.
12. Silverstein, R.L. and M. Febbraio, *CD36 and atherosclerosis*. *Current Opinion in Lipidology*, 2000. **11**(5): p. 483-491.
13. Björkerud, B. and S.r. Björkerud, *Contrary Effects of Lightly and Strongly Oxidized LDL With Potent Promotion of Growth Versus Apoptosis on Arterial Smooth Muscle Cells, Macrophages, and Fibroblasts*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1996. **16**(3): p. 416-424.
14. Cai, W.-j., et al., *The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions*. *Atherosclerosis*, 1997. **131**(2): p. 177.
15. Jacobson, M.D., M. Weil, and M.C. Raff, *Programmed Cell Death in Animal Development*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 347.
16. Van Cruchten, S. and W. Van den Broeck, *Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 2002. **31**(4): p. 214.
17. Nicholson, D.W. and N.A. Thornberry, *Caspases: killer proteases*. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997. **22**(8): p. 299.
18. Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit, *APOPTOSIS SIGNALING*. *Annual Review of Biochemistry*, 2000. **69**(1): p. 217-245.

19. Kaufmann, S.H. and M.O. Hengartner, *Programmed cell death: alive and well in the new millennium*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(12): p. 526.
20. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2000. **32**(11-12): p. 1123.
21. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell Death: Critical Control Points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205.
22. Micheau, O. and J.r. Tschopp, *Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181.
23. Arnoult, D., et al., *Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization*. EMBO J, 2003. **22**(17): p. 4385.
24. Borner, C., *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions*. Molecular Immunology, 2003. **39**(11): p. 615.
25. Vaux, D.L., S. Cory, and J.M. Adams, *Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells*. Nature, 1988. **335**(6189): p. 440.
26. Strasser, A., A.W. Harris, and S. Cory, *bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship*. Cell, 1991. **67**(5): p. 889.
27. Veis, D.J., et al., *Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair*. Cell, 1993. **75**(2): p. 229.
28. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Current Opinion in Cell Biology, 2005. **17**(6): p. 617.
29. Kuwana, T., et al., *BH3 Domains of BH3-Only Proteins Differentially Regulate Bax-Mediated Mitochondrial Membrane Permeabilization Both Directly and Indirectly*. Molecular Cell, 2005. **17**(4): p. 525.
30. Bennett, M.R., *Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture*. Cardiovascular Research, 1999. **41**(2): p. 361-368.
31. Kockx, M.M. and A.G. Herman, *Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?* Cardiovascular Research, 2000. **45**(3): p. 736-746.
32. Tricot, O., et al., *Relation Between Endothelial Cell Apoptosis and Blood Flow Direction in Human Atherosclerotic Plaques*. Circulation, 2000. **101**(21): p. 2450-2453.
33. Kolodgie, F.D., et al., *Localization of Apoptotic Macrophages at the Site of Plaque Rupture in Sudden Coronary Death*. The American Journal of Pathology, 2000. **157**(4): p. 1259.
34. Yao, P.M. and I. Tabas, *Free Cholesterol Loading of Macrophages Is Associated with Widespread Mitochondrial Dysfunction and Activation of the Mitochondrial Apoptosis Pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(45): p. 42468-42476.
35. Panini, S.R., et al., *Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol*. Journal of Lipid Research, 2001. **42**(10): p. 1678-1686.
36. Saxena, A., J.D. McMeekin, and D.J. Thomson, *Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens*. The Journal of Pathology, 2002. **196**(3): p. 335.
37. Martinet, W., et al., *Gene Expression Profiling of Apoptosis-Related Genes in Human Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. **22**(12): p. 2023-2029.

38. Liu, J., et al., *Reduced Macrophage Apoptosis Is Associated With Accelerated Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Null Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(1): p. 174-179.
39. Hegyi, L., et al., *FOAM CELL APOPTOSIS AND THE DEVELOPMENT OF THE LIPID CORE OF HUMAN ATHEROSCLEROSIS*. The Journal of Pathology, 1996. **180**(4): p. 423.
40. Ball, R.Y., et al., *Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma*. Atherosclerosis, 1995. **114**(1): p. 45.
41. van Vlijmen, B.J.M., et al., *Macrophage p53 Deficiency Leads to Enhanced Atherosclerosis in APOE*3-Leiden Transgenic Mice*. Circulation Research, 2001. **88**(8): p. 780-786.
42. Merched, A.J., E. Williams, and L. Chan, *Macrophage-Specific p53 Expression Plays a Crucial Role in Atherosclerosis Development and Plaque Remodeling*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(9): p. 1608-1614.
43. Arai, S., et al., *A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Sp1±/Api6 in atherosclerosis development*. Cell Metabolism, 2005. **1**(3): p. 201.
44. Gautier, E.L., et al., *Macrophage Apoptosis Exerts Divergent Effects on Atherogenesis as a Function of Lesion Stage*. Circulation, 2009. **119**(13): p. 1795-1804.
45. Brown, S., et al., *Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 200.
46. Okazawa, H., et al., *Negative Regulation of Phagocytosis in Macrophages by the CD47-SHPS-1 System*. The Journal of Immunology, 2005. **174**(4): p. 2004-2011.
47. Schutters, K. and C. Reutelingsperger, *Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases*. Apoptosis, 2010. **15**(9): p. 1072.
48. Arur, S., et al., *Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment*. Developmental Cell, 2003. **4**(4): p. 587.
49. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349.
50. Rothlin, C.V., et al., *TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1124.
51. Peet, D.J., et al., *Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR±*. Cell, 1998. **93**(5): p. 693.
52. Castrillo, A. and P. Tontonoz, *PPARs in atherosclerosis: the clot thickens*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **114**(11): p. 1538.
53. A-Gonzalez, N., et al., *Apoptotic Cells Promote Their Own Clearance and Immune Tolerance through Activation of the Nuclear Receptor LXR*. Immunity, 2009. **31**(2): p. 245.
54. Schrijvers, D.M., et al., *Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(6): p. 1256-1261.
55. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis*. Journal of Leukocyte Biology, 2009. **86**(5): p. 1089-1095.
56. Peter, C., et al., *Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells*. Apoptosis, 2010. **15**(9): p. 1007.
57. Swirski, F.K., et al., *Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2006. **103**(27): p. 10340-10345.

58. Tabas, I., *Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(11): p. 2255-2264.
59. Boisvert, W.A., et al., *Leukocyte Transglutaminase 2 Expression Limits Atherosclerotic Lesion Size*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(3): p. 563-569.
60. Bhatia, V.K., et al., *Complement C1q Reduces Early Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice*. The American Journal of Pathology, 2007. **170**(1): p. 416.
61. Ait-Oufella, H., et al., *Lactadherin Deficiency Leads to Apoptotic Cell Accumulation and Accelerated Atherosclerosis in Mice*. Circulation, 2007. **115**(16): p. 2168-2177.
62. Li, Y., et al., *Cholesterol-induced Apoptotic Macrophages Elicit an Inflammatory Response in Phagocytes, Which Is Partially Attenuated by the Mer Receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(10): p. 6707-6717.
63. Miller, Y.I., et al., *Minimally Modified LDL Binds to CD14, Induces Macrophage Spreading via TLR4/MD-2, and Inhibits Phagocytosis of Apoptotic Cells*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(3): p. 1561-1568.
64. Sather, S., et al., *A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1026-1033.
65. Komura, H., et al., *Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor-Factor VIII Is Down-Regulated in Sepsis via the Lipopolysaccharide-CD14 Pathway*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(1): p. 581-587.
66. Canault, M., et al., *The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: Possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors*. Atherosclerosis, 2006. **187**(1): p. 82.
67. Krysko, O., et al., *Impairment of phagocytosis of apoptotic cells and its role in chronic airway diseases*. Apoptosis, 2010. **15**(9): p. 1137.
68. Vandivier, R.W., et al., *Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **109**(5): p. 661.
69. Kamen, L.A., J. Levinsohn, and J.A. Swanson, *Differential Association of Phosphatidylinositol 3-Kinase, SHIP-1, and PTEN with Forming Phagosomes*. Molecular Biology of the Cell, 2007. **18**(7): p. 2463-2472.
70. Li, S., et al., *Defective Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages in Atherosclerotic Lesions of ob/ob Mice and Reversal by a Fish Oil Diet*. Circulation Research, 2009. **105**(11): p. 1072-1082.
71. Fougerat, A., et al., *Genetic and Pharmacological Targeting of Phosphoinositide 3-Kinase- β Reduces Atherosclerosis and Favors Plaque Stability by Modulating Inflammatory Processes*. Circulation, 2008. **117**(10): p. 1310-1317.
72. Poon, I.K.H., M.D. Hulett, and C.R. Parish, *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance*. Cell Death Differ, 2009. **17**(3): p. 381.
73. Savill, J., et al., *A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 965.
74. Khan, M., et al., *Oxidised lipoproteins may promote inflammation through the selective delay of engulfment but not binding of apoptotic cells by macrophages*. Atherosclerosis, 2003. **171**(1): p. 21.

75. Grainger, D.J., J. Reckless, and E. McKilligin, *Apolipoprotein E Modulates Clearance of Apoptotic Bodies In Vitro and In Vivo, Resulting in a Systemic Proinflammatory State in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(10): p. 6366-6375.
76. Aprahamian, T., et al., *Impaired Clearance of Apoptotic Cells Promotes Synergy between Atherogenesis and Autoimmune Disease*. The Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**(8): p. 1121-1131.
77. Gautier, E.L., et al., *Enhanced Immune System Activation and Arterial Inflammation Accelerates Atherosclerosis in Lupus-Prone Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(7): p. 1625-1631.
78. Hansson, G.K., *Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(16): p. 1685-1695.
79. Wick, G., M. Knoflach, and Q. Xu, *Autoimmune and Inflammatory Mechanisms in Atherosclerosis*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**(1): p. 361-403.
80. Afek, A., et al., *Immunization of Low-density Lipoprotein Receptor Deficient (LDL-RD) Mice with Heat Shock Protein 65 (HSP-65) Promotes Early Atherosclerosis*. Journal of Autoimmunity, 2000. **14**(2): p. 115.
81. Harats, D., et al., *Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates mycobacterium tuberculosis-induced and high-fat-diet-driven atherosclerotic lesions*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **40**(7): p. 1333.
82. Maron, R., et al., *Mucosal Administration of Heat Shock Protein-65 Decreases Atherosclerosis and Inflammation in Aortic Arch of Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice*. Circulation, 2002. **106**(13): p. 1708-1715.
83. Stemme, S., et al., *T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(9): p. 3893-3897.
84. Zhou, X., et al., *Adoptive Transfer of CD4+ T Cells Reactive to Modified Low-Density Lipoprotein Aggravates Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006. **26**(4): p. 864-870.
85. Ameli, S., et al., *Effect of Immunization With Homologous LDL and Oxidized LDL on Early Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Rabbits*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1996. **16**(8): p. 1074-1079.
86. Fredrikson, G.N., et al., *Atheroprotective immunization with MDA-modified apo B-100 peptide sequences is associated with activation of Th2 specific antibody expression*. Autoimmunity, 2005. **38**(2): p. 171-179.
87. Salonen, J.T., et al., *Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis*. The Lancet, 1992. **339**(8798): p. 883.
88. Dansky, H.M., et al., *T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(9): p. 4642-4646.
89. Weber, C., A. Zernecke, and P. Libby, *The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 802.
90. Hansson, G.K., A.-K.L. Robertson, and C. S  nderberg-Naucl  r, *INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2006. **1**(1): p. 297-329.
91. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice*. The Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**(11): p. 2752.

92. Whitman, S.C., et al., *Exogenous Interferon- β Enhances Atherosclerosis in Apolipoprotein E $^{-/-}$ Mice*. The American Journal of Pathology, 2000. **157**(6): p. 1819.
93. Whitman, S.C., P. Ravisankar, and A. Daugherty, *IFN- β Deficiency Exerts Gender-Specific Effects on Atherogenesis in Apolipoprotein E $^{-/-}$ Mice*. Journal of Interferon & Cytokine Research, 2002. **22**(6): p. 661.
94. Buono, C., et al., *Influence of Interferon- β on the Extent and Phenotype of Diet-Induced Atherosclerosis in the LDLR-Deficient Mouse*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(3): p. 454-460.
95. Lee, T.-S., et al., *The Role of Interleukin 12 in the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1999. **19**(3): p. 734-742.
96. Davenport, P. and P.G. Tipping, *The Role of Interleukin-4 and Interleukin-12 in the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. The American Journal of Pathology, 2003. **163**(3): p. 1117.
97. Hauer, A.D., et al., *Blockade of Interleukin-12 Function by Protein Vaccination Attenuates Atherosclerosis*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1054-1062.
98. Buono, C., et al., *T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(5): p. 1596-1601.
99. Zhou, X., et al., *Transfer of CD4 $^{+}$ T Cells Aggravates Atherosclerosis in Immunodeficient Apolipoprotein E Knockout Mice*. Circulation, 2000. **102**(24): p. 2919-2922.
100. Laurat, E., et al., *In Vivo Downregulation of T Helper Cell 1 Immune Responses Reduces Atherogenesis in Apolipoprotein E-Knockout Mice*. Circulation, 2001. **104**(2): p. 197-202.
101. de Boer, O.J., et al., *Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques*. The Journal of Pathology, 2009. **220**(4): p. 499.
102. Eid, R.E., et al., *Interleukin-17 and Interferon- β Are Produced Concomitantly by Human Coronary Artery-Infiltrating T Cells and Act Synergistically on Vascular Smooth Muscle Cells*. Circulation, 2009. **119**(10): p. 1424-1432.
103. Cui, G., et al., *Liver X receptor (LXR) mediates negative regulation of mouse and human Th17 differentiation*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(2): p. 658.
104. Xie, J.-j., et al., *The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE $^{-/-}$ mice*. Cytokine, 2010. **49**(2): p. 185.
105. Erbel, C., et al., *Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice*. The Journal of Immunology, 2009. **183**(12): p. 8167-8175.
106. van Es, T., et al., *Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **388**(2): p. 261.
107. Madhur, M.S., et al., *Role of Interleukin 17 in Inflammation, Atherosclerosis, and Vascular Function in Apolipoprotein E $^{-/-}$ Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2011. **31**(7): p. 1565-1572.
108. Taleb, S., et al., *Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(10): p. 2067-2077.

109. Taniguchi, M., K.-i. Seino, and T. Nakayama, *The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1164.
110. Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter, *Raising the NKT cell family*. Nat Immunol, 2010. **11**(3): p. 197.
111. Kyriakakis, E., et al., *Invariant natural killer T cells: Linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis*. European Journal of Immunology, 2010. **40**(11): p. 3268.
112. Aslanian, A.M., H.A. Chapman, and I.F. Charo, *Transient Role for CD1d-Restricted Natural Killer T Cells in the Formation of Atherosclerotic Lesions*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**(3): p. 628-632.
113. Tupin, E., et al., *CD1d-dependent Activation of NKT Cells Aggravates Atherosclerosis*. The Journal of Experimental Medicine, 2004. **199**(3): p. 417-422.
114. Zhou and Hansson, *Detection of B Cells and Proinflammatory Cytokines in Atherosclerotic Plaques of Hypercholesterolaemic Apolipoprotein E Knockout Mice*. Scandinavian Journal of Immunology, 1999. **50**(1): p. 25.
115. George, J., et al., *Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 147.
116. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice*. The Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(8): p. 1579-1587.
117. Caligiuri, G., et al., *Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 745-53.
118. Kyaw, T., et al., *B1a B Lymphocytes Are Atheroprotective by Secreting Natural IgM That Increases IgM Deposits and Reduces Necrotic Cores in Atherosclerotic Lesions / Novelty and Significance*. Circulation Research, 2011. **109**(8): p. 830-840.
119. Lipinski, M.J., et al., *Comment on "Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis"*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(1): p. 4.
120. Frostegard, J., et al., *Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 33.
121. King, V.L., S.J. Szilvassy, and A. Daugherty, *Interleukin-4 Deficiency Decreases Atherosclerotic Lesion Formation in a Site-Specific Manner in Female LDL Receptor^{-/-} Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2002. **22**(3): p. 456-461.
122. Huber, S.A., et al., *T Helper¹-Cell Phenotype Regulates Atherosclerosis in Mice Under Conditions of Mild Hypercholesterolemia*. Circulation, 2001. **103**(21): p. 2610-2616.
123. Schulte, S., G.K. Sukhova, and P. Libby, *Genetically Programmed Biases in Th1 and Th2 Immune Responses Modulate Atherogenesis*. The American Journal of Pathology, 2008. **172**(6): p. 1500.
124. Miller, A.M., et al., *IL-33 reduces the development of atherosclerosis*. The Journal of Experimental Medicine, 2008. **205**(2): p. 339-346.
125. Mallat, Z., et al., *Induction of a Regulatory T Cell Type 1 Response Reduces the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E^{-/-} Knockout Mice*. Circulation, 2003. **108**(10): p. 1232-1237.
126. Klingenberg, R., et al., *Intranasal Immunization With an Apolipoprotein B-100 Fusion Protein Induces Antigen-Specific Regulatory T Cells and Reduces Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(5): p. 946-952.

127. Ammirati, E., et al., *Circulating CD4+CD25^{hi}CD127^{lo} Regulatory T-Cell Levels Do Not Reflect the Extent or Severity of Carotid and Coronary Atherosclerosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2010. **30**(9): p. 1832-1841.
128. Nadig, S.N., et al., *In vivo prevention of transplant arteriosclerosis by ex vivo-expanded human regulatory T cells*. *Nat Med*, 2010. **16**(7): p. 809.
129. de Boer, O.J., et al., *Low Numbers of FOXP3 Positive Regulatory T Cells Are Present in all Developmental Stages of Human Atherosclerotic Lesions*. *PLoS ONE*, 2007. **2**(8): p. e779.
130. Veillard, N.R., et al., *Differential Expression Patterns of Proinflammatory and Antiinflammatory Mediators During Atherogenesis in Mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004. **24**(12): p. 2339-2344.
131. Ait-Oufella, H., et al., *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 178.
132. Mor, A., et al., *Role of Naturally Occurring CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Experimental Atherosclerosis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2007. **27**(4): p. 893-900.
133. Foks, A.C., et al., *Differential effects of regulatory T cells on the initiation and regression of atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2011. **218**(1): p. 53.
134. Dietrich, T., et al., *Local delivery of IL-2 reduces atherosclerosis via expansion of regulatory T cells*. *Atherosclerosis*, 2011(0).
135. Sasaki, N., et al., *Oral Anti-CD3 Antibody Treatment Induces Regulatory T Cells and Inhibits the Development of Atherosclerosis in Mice*. *Circulation*, 2009. **120**(20): p. 1996-2005.
136. Lin, J., et al., *The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in macrophage-derived foam-cell formation*. *Journal of Lipid Research*, 2010. **51**(5): p. 1208-1217.
137. Major, A.S., S. Fazio, and M.F. Linton, *B-Lymphocyte Deficiency Increases Atherosclerosis in LDL Receptor^{0/0} Null Mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002. **22**(11): p. 1892-1898.
138. Karvonen, J., et al., *Immunoglobulin M Type of Autoantibodies to Oxidized Low-Density Lipoprotein Has an Inverse Relation to Carotid Artery Atherosclerosis*. *Circulation*, 2003. **108**(17): p. 2107-2112.
139. Tsimikas, S., et al., *Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events*. *Journal of Lipid Research*, 2007. **48**(2): p. 425-433.
140. Caligiuri, G., et al., *Phosphorylcholine-Targeting Immunization Reduces Atherosclerosis*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2007. **50**(6): p. 540.
141. Binder, C.J., et al., *IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2004. **114**(3): p. 427.
142. Wardemann, H., et al., *B-1a B Cells that Link the Innate and Adaptive Immune Responses Are Lacking in the Absence of the Spleen*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2002. **195**(6): p. 771-780.
143. Ehrenstein, M.R. and C.A. Notley, *The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(11): p. 778.
144. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. *Blood*, 2010. **116**(16): p. e74-e80.
145. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953.

146. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells*. Annual Review of Immunology, 2009. **27**(1): p. 669-692.
147. Ingersoll, M.A., et al., *Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets*. Blood, 2010. **115**(3): p. e10-e19.
148. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(1): p. 185.
149. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(1): p. 195.
150. Yancey, P.G., et al., *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Prevents Early Atherosclerosis by Limiting Lesional Apoptosis and Inflammatory Ly-6Chi Monocytosis / Clinical Perspective*. Circulation, 2011. **124**(4): p. 454-464.
151. Swirski, F.K., R. Weissleder, and M.J. Pittet, *Heterogeneous In Vivo Behavior of Monocyte Subsets in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009. **29**(10): p. 1424-1432.
152. Rajavashisth, T., et al., *Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(12): p. 2702.
153. Brauersreuther, V., et al., *Ccr5 But Not Ccr1 Deficiency Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Mice*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(2): p. 373-379.
154. Zernecke, A., E. Shagdarsuren, and C. Weber, *Chemokines in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(11): p. 1897-1908.
155. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894.
156. C. Dawson, T., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 1999. **143**(1): p. 205.
157. Combadière, C., et al., *Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in CX3CR1/Apolipoprotein E Double Knockout Mice*. Circulation, 2003. **107**(7): p. 1009-1016.
158. Lesnik, P., C.A. Haskell, and I.F. Charo, *Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis*. The Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(3): p. 333.
159. Zernecke, A., et al., *Deficiency in CCR5 but not CCR1 protects against neointima formation in atherosclerosis-prone mice: involvement of IL-10*. Blood, 2006. **107**(11): p. 4240-4243.
160. Combadière, C., et al., *Combined Inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 Abrogates Ly6Chi and Ly6Clo Monocytosis and Almost Abolishes Atherosclerosis in Hypercholesterolemic Mice*. Circulation, 2008. **117**(13): p. 1649-1657.
161. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(12): p. 3037-3047.
162. Cheng, C., et al., *Shear stress-induced changes in atherosclerotic plaque composition are modulated by chemokines*. The Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(3): p. 616.
163. Cain, D.W. and M.D. Gunn, *NUR who? An orphan transcription factor holds promise for monomaniacs*. Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 727.

164. Millonig, G., et al., *Network of Vascular-Associated Dendritic Cells in Intima of Healthy Young Individuals*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001. **21**(4): p. 503-508.
165. Liu, P., et al., *CX3CR1 Deficiency Impairs Dendritic Cell Accumulation in Arterial Intima and Reduces Atherosclerotic Burden*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(2): p. 243-250.
166. Bobryshev, Y.V., *Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance*. European Heart Journal, 2005. **26**(17): p. 1700-1704.
167. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques*. Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101.
168. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410.
169. Hansson, G.r.K., et al., *Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Circulation Research, 2002. **91**(4): p. 281-291.
170. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. The Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**(1): p. 83-93.
171. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. The Journal of Experimental Medicine, 1994. **179**(4): p. 1109-1118.
172. Hou, B., B. Reizis, and A.L. DeFranco, *Toll-like Receptors Activate Innate and Adaptive Immunity by using Dendritic Cell-Intrinsic and -Extrinsic Mechanisms*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 272.
173. Galkina, E., et al., *Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(5): p. 1273-1282.
174. Jongstra-Bilen, J., et al., *Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(9): p. 2073-2083.
175. Paulson, K.E., et al., *Resident Intimal Dendritic Cells Accumulate Lipid and Contribute to the Initiation of Atherosclerosis*. Circulation Research, 2010. **106**(2): p. 383-390.
176. Habets, K.L.L., et al., *Vaccination using oxidized low-density lipoprotein-pulsed dendritic cells reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. Cardiovascular Research, 2010. **85**(3): p. 622-630.
177. Alderman, C.J.J., et al., *Effects of oxidised low density lipoprotein on dendritic cells: a possible immunoregulatory component of the atherogenic micro-environment?* Cardiovascular Research, 2002. **55**(4): p. 806-819.
178. Liu, K., et al., *In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-397.
179. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19.
180. Onai, N., et al., *Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. **203**(1): p. 227-238.
181. Cheong, C., et al., *Microbial Stimulation Fully Differentiates Monocytes to DC-SIGN/CD209+ Dendritic Cells for Immune T Cell Areas*. Cell, 2010. **143**(3): p. 416.
182. Merad, M. and M.G. Manz, *Dendritic cell homeostasis*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3418-3427.

183. Choi, J.-H., et al., *Flt3 Signaling-Dependent Dendritic Cells Protect against Atherosclerosis*. *Immunity*, 2011. **35**(5): p. 819.
184. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002. **99**(1): p. 351-358.
185. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells*. *Nat Med*, 1999. **5**(11): p. 1249.
186. Austyn, J.M., *Death, destruction, danger and dendritic cells*. *Nat Med*, 1999. **5**(11): p. 1232.
187. Rovere, P., et al., *Remnants of suicidal cells fostering systemic autoaggression: Apoptosis in the origin and maintenance of autoimmunity*. *Arthritis & Rheumatism*, 2000. **43**(8): p. 1663.
188. Niessner, A., et al., *Pathogen-Sensing Plasmacytoid Dendritic Cells Stimulate Cytotoxic T-Cell Function in the Atherosclerotic Plaque Through Interferon- γ* . *Circulation*, 2006. **114**(23): p. 2482-2489.
189. Park, K. and A.L. Scott, *Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2010. **88**(6): p. 1081-1087.
190. Wang, H., et al., *The Role of Glycogen Synthase Kinase 3 in Regulating IFN- γ -Mediated IL-10 Production*. *The Journal of Immunology*, 2011. **186**(2): p. 675-684.
191. Ochando, J.C., et al., *Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(6): p. 652.
192. Niessner, A., et al., *Synergistic Proinflammatory Effects of the Antiviral Cytokine Interferon- α and Toll-Like Receptor 4 Ligands in the Atherosclerotic Plaque*. *Circulation*, 2007. **116**(18): p. 2043-2052.
193. Daissormont, I.T.M.N., et al., *Plasmacytoid Dendritic Cells Protect Against Atherosclerosis by Tuning T-Cell Proliferation and Activity / Novelty and Significance*. *Circulation Research*, 2011. **109**(12): p. 1387-1395.
194. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis: The Road Ahead*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 503.
195. Miller, Y.I., et al., *Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity*. *Circulation Research*, 2011. **108**(2): p. 235-248.
196. Li, M., et al., *An Essential Role of the NF- κ B/Toll-Like Receptor Pathway in Induction of Inflammatory and Tissue-Repair Gene Expression by Necrotic Cells*. *The Journal of Immunology*, 2001. **166**(12): p. 7128-7135.
197. Kawakami, A., et al., *Toll-Like Receptor 2 Mediates Apolipoprotein CIII-Induced Monocyte Activation*. *Circulation Research*, 2008. **103**(12): p. 1402-1409.
198. Seimon, T.A., et al., *Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress*. *Cell Metabolism*, 2010. **12**(5): p. 467.
199. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(2): p. 155.
200. Xu, X.H., et al., *Toll-Like Receptor-4 Is Expressed by Macrophages in Murine and Human Lipid-Rich Atherosclerotic Plaques and Upregulated by Oxidized LDL*. *Circulation*, 2001. **104**(25): p. 3103-3108.
201. Edfeldt, K., et al., *Expression of Toll-Like Receptors in Human Atherosclerotic Lesions*. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1158-1161.

202. Schoneveld, A.H., et al., *Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness*. *Atherosclerosis*, 2008. **197**(1): p. 95.
203. Geng, H.L., et al., *Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral-blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2006. **143**(2): p. 269.
204. Kuwahata, S., et al., *High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease*. *Atherosclerosis*, 2009. **209**(1): p. 248.
205. Michelsen, K.S., et al., *Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(29): p. 10679-10684.
206. Bjorkbacka, H., et al., *Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways*. *Nat Med*, 2004. **10**(4): p. 416.
207. Li, D. and J.L. Mehta, *Antisense to LOX-1 Inhibits Oxidized LDL-Mediated Upregulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Monocyte Adhesion to Human Coronary Artery Endothelial Cells*. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2889-2895.
208. Cominacini, L., et al., *Oxidized Low Density Lipoprotein (ox-LDL) Binding to ox-LDL Receptor-1 in Endothelial Cells Induces the Activation of NF- κ B through an Increased Production of Intracellular Reactive Oxygen Species*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(17): p. 12633-12638.
209. Yan, Z.-q. and G.K. Hansson, *Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis*. *Immunological Reviews*, 2007. **219**(1): p. 187.
210. Martinon, F., A. Mayor, and J.r. Tschopp, *The Inflammasomes: Guardians of the Body*. *Annual Review of Immunology*, 2009. **27**(1): p. 229-265.
211. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. *Nature*, 2010. **464**(7293): p. 1357.
212. Bauernfeind, F.G., et al., *Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(2): p. 787-791.
213. Kanters, E., et al., *Inhibition of NF- κ B activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. **112**(8): p. 1176.
214. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(1): p. 23.
215. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(10): p. 889.
216. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression*. *The Journal of Immunology*, 2006. **177**(10): p. 7303-7311.
217. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective*. *Annual Review of Immunology*, 2009. **27**(1): p. 451-483.
218. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006. **80**(6): p. 1298-1307.
219. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends in Immunology*, 2004. **25**(12): p. 677.

220. McLaren, J.E. and D.P. Ramji, *Interferon gamma: A master regulator of atherosclerosis*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009. **20**(2): p. 125.
221. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958.
222. Szekanecz, Z.n. and A.E. Koch, *Macrophages and their products in rheumatoid arthritis*. Current Opinion in Rheumatology, 2007. **19**(3): p. 289-295
10.1097/BOR.0b013e32805e87ae.
223. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals*. The Journal of Pathology, 2008. **214**(2): p. 161.
224. Bouhlel, M.A., et al., *PPAR β Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties*. Cell Metabolism, 2007. **6**(2): p. 137.
225. Tabas, I., *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 36.
226. Gerber, J.S. and D.M. Mosser, *Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc γ Receptors*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(11): p. 6861-6868.
227. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. The Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(4): p. 890.
228. Lucas, M., et al., *ERK Activation Following Macrophage Fc γ R Ligation Leads to Chromatin Modifications at the IL-10 Locus*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(1): p. 469-477.
229. Loke, P.n., et al., *Alternative Activation Is an Innate Response to Injury That Requires CD4⁺ T Cells to be Sustained during Chronic Infection*. The Journal of Immunology, 2007. **179**(6): p. 3926-3936.
230. Peng, Y., Y. Latchman, and K.B. Elkon, *Ly6Clow Monocytes Differentiate into Dendritic Cells and Cross-Tolerize T Cells through PDL-1*. The Journal of Immunology, 2009. **182**(5): p. 2777-2785.
231. Odegaard, J.I., et al., *Macrophage-specific PPAR[α] controls alternative activation and improves insulin resistance*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1116.
232. Mitchell, S., et al., *Lipoxins, Aspirin-Triggered Epi-Lipoxins, Lipoxin Stable Analogues, and the Resolution of Inflammation: Stimulation of Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils In Vivo*. Journal of the American Society of Nephrology, 2002. **13**(10): p. 2497-2507.
233. Chinetti-Gbaguidi, G., et al., *Human Atherosclerotic Plaque Alternative Macrophages Display Low Cholesterol Handling but High Phagocytosis Because of Distinct Activities of the PPAR β and LXR β Pathways / Novelty and Significance*. Circulation Research, 2011. **108**(8): p. 985-995.
234. Khallou-Laschet, J., et al., *Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis*. PLoS ONE, 2010. **5**(1): p. e8852.
235. Duval, C., et al., *The role of PPARs in atherosclerosis*. Trends in Molecular Medicine, 2002. **8**(9): p. 422.
236. Stoneman, V., et al., *Monocyte/Macrophage Suppression in CD11b Diphtheria Toxin Receptor Transgenic Mice Differentially Affects Atherogenesis and Established Plaques*. Circulation Research, 2007. **100**(6): p. 884-893.

237. Machida, Y., et al., *Renal Fibrosis in Murine Obstructive Nephropathy Is Attenuated by Depletion of Monocyte Lineage, Not Dendritic Cells*. Journal of Pharmacological Sciences, 2010. **114**(4): p. 464.
238. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762.
239. Woollard, K.J. and F. Geissmann, *Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(2): p. 77.
240. Geissmann, F., et al., *Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-661.
241. Potteaux, S., et al., *Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of ApoE^{-/-} mice during disease regression*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(5): p. 2025.
242. Fancke, B., et al., *M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin*. Blood, 2008. **111**(1): p. 150-159.
243. Ichikawa, H.T., et al., *Novel proteasome inhibitors have a beneficial effect in murine lupus via the dual inhibition of type I interferon and autoantibody secreting cells*. Arthritis & Rheumatism, 2011: p. n/a.
244. Moseman, E.A., et al., *Human Plasmacytoid Dendritic Cells Activated by CpG Oligodeoxynucleotides Induce the Generation of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(7): p. 4433-4442.
245. Maldonado-Lopez, R., et al., *CD8⁺ and CD8⁺ Subclasses of Dendritic Cells Direct the Development of Distinct T Helper Cells In Vivo*. The Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(3): p. 587-592.
246. Pulendran, B., et al., *Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(3): p. 1036-1041.
247. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of Dendritic Cells*. Annual Review of Immunology, 2000. **18**(1): p. 767-811.
248. Maldonado-Lopez, R. and M. Moser, *Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses*. Seminars in Immunology, 2001. **13**(5): p. 275.
249. Mazzocchi, G., et al., *Anti-tumor necrosis factor- α therapy and changes of flow-mediated vasodilatation in psoriatic and rheumatoid arthritis patients*. Internal and Emergency Medicine, 2010. **5**(6): p. 495.
250. Pollono, E., et al., *A systematic review of the effect of TNF- α antagonists on lipid profiles in patients with rheumatoid arthritis*. Clinical Rheumatology, 2010. **29**(9): p. 947.
251. Bosello, S., et al., *TNF- α blockade induces a reversible but transient effect on endothelial dysfunction in patients with long-standing severe rheumatoid arthritis*. Clinical Rheumatology, 2008. **27**(7): p. 833.
252. Betts, B.C., et al., *Anti-IL6-receptor- α (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses*. Blood, 2011. **118**(19): p. 5340-5343.
253. Szalat, R., et al., *Pathogenesis and treatment of xanthomatosis associated with monoclonal gammopathy*. Blood, 2011. **118**(14): p. 3777-84.
254. Larrede, S., et al., *Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2009. **29**(11): p. 1930-1936.
255. Feingold, K.R., et al., *Cutaneous xanthoma in association with paraproteinemia in the absence of hyperlipidemia*. The Journal of Clinical Investigation, 1989. **83**(3): p. 796.

256. Nigon, F., et al., *Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor*. Journal of Lipid Research, 1991. **32**(11): p. 1741-53.
257. Griffin, B.A., et al., *Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk*. Atherosclerosis, 1994. **106**(2): p. 241.
258. de Graaf, J., et al., *Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1991. **11**(2): p. 298-306.
259. Yvan-Charvet, L., N. Wang, and A.R. Tall, *Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010. **30**(2): p. 139-143.
260. Choi, S.-H., et al., *Lipoprotein Accumulation in Macrophages via Toll-Like Receptor-4-Dependent Fluid Phase Uptake*. Circulation Research, 2009. **104**(12): p. 1355-1363.
261. Arnaud, L., et al., *Systemic perturbation of cytokine and chemokine networks in Erdheim-Chester disease: a single-center series of 37 patients*. Blood, 2011. **117**(10): p. 2783-2790.
262. Chu, C.-C., P. Di Meglio, and F.O. Nestle, *Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases*. Seminars in Immunology, 2011. **23**(1): p. 28.
263. narbutt, *The number and distribution of blood dendritic cells in the epidermis and dermis of healthy human subjects*. Folia Histochem Cytobiol, 2006. **44**((1)): p. 61-3.
264. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood*. The Journal of Immunology, 2000. **165**(11): p. 6037-6046.
265. Goubier, A., et al., *Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 464-75.
266. Liu, Y.-J., *IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**(1): p. 275-306.
267. Noessner, E., et al., *Dendritic Cells in Human Renal Inflammation - Part II*. Nephron Exp Nephrol, 2011. **119**(4): p. e91-8.
268. Saadoun, D., et al., *Regulatory T-Cell Responses to Low-Dose Interleukin-2 in HCV-Induced Vasculitis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(22): p. 2067-2077.
269. Koreth, J., et al., *Interleukin-2 and Regulatory T Cells in Graft-versus-Host Disease*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(22): p. 2055-2066.
270. Johnson, T.R., et al., *Primary human mDC1, mDC2, and pDC dendritic cells are differentially infected and activated by respiratory syncytial virus*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16458.
271. Jongbloed, S.L., et al., *Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1247-60.
272. Bachem, A., et al., *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. J Exp Med. **207**(6): p. 1273-81.
273. Poulin, L.F., et al., *Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(6): p. 1261-71.

274. Crozat, K., et al., *The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells*. J Exp Med. **207**(6): p. 1283-92.
275. Mittag, D., et al., *Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(11): p. 6207-6217.
276. Yerkovich, S.T., et al., *Allergen-enhanced thrombomodulin (blood dendritic cell antigen 3, CD141) expression on dendritic cells is associated with a TH2-skewed immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(1): p. 209-216 e4.
277. Vogelsang, P., et al., *Levels of plasmacytoid dendritic cells and type-2 myeloid dendritic cells are reduced in peripheral blood of patients with primary Sjögren's syndrome*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2009. **69**(6): p. 1235-1238.
278. Mohamadzadeh, M., et al., *Interleukin 15 Skews Monocyte Differentiation into Dendritic Cells with Features of Langerhans Cells*. The Journal of Experimental Medicine, 2001. **194**(7): p. 1013-1020.
279. Aschermann, S., et al., *The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation*. Clinical & Experimental Immunology, 2010. **160**(2): p. 161.
280. Schultz, O., et al., *Effects of Inhibition of Interleukin-6 Signalling on Insulin Sensitivity and Lipoprotein (A) Levels in Human Subjects with Rheumatoid Diseases*. PLoS ONE. **5**(12): p. e14328.

Annexes

1. Annexe 1 :Revue : Immuno-inflammation dans l'athérosclérose

Immuno-inflammation dans l'athérosclérose

John PIRAULT
Philippe LESNIK

Unité mixte de recherche Inserm U-939,
UPMC « Dyslipidémie, Inflammation et
Athérosclérose »,
Pavillon Benjamin Delessert,
1er étage,
Hôpital de la Pitié,
83, boulevard de l'hôpital,
75 651 Paris Cedex 13,
France
<philippe.lesnik@upmc.fr>

Abstract: A fundamental feature of atherosclerosis is a chronic inflammation of the arterial intima characterised by the accumulation of low-density lipoproteins and cells undergoing apoptosis. Such material can be subject to modifications if not efficiently cleared. For example, the LDL can become oxidised or the apoptotic cells necrotic, both of which are highly immunogenic and inflammatory. These modified, endogenous structures can generate an auto-immune or "sterile inflammation" response and are the targets of both innate and adaptive immunity. Therefore, one can refer to atherosclerosis, in part, as an auto-immune disease

Key words: atherosclerosis, chronic inflammation, arterial intima, cholesterol, low density lipoproteins, immunity

L'athérosclérose se caractérise par une inflammation chronique de l'intima artérielle marquée par l'accumulation de lipoprotéines LDL et de cellules apoptotiques. Ce matériel biologique lorsqu'il n'est pas efficacement éliminé subit des modifications (les LDL s'oxydent et les cellules apoptotiques se nécrosent) le rendant fortement inflammatoire et immunogène. Ces structures endogènes modifiées génèrent de l'auto-réactivité et sont la cible du système immunitaire inné et adaptatif (tableau 1). Cette réaction contre le soi modifié fait considérer l'athérosclérose comme une maladie en partie auto-immune.

La réponse non-spécifique : immunité innée

La réponse inflammatoire dans l'athérosclérose comporte des éléments à la fois de la réponse immunitaire innée et adaptative (figures 1 et 2). Le bras primitif de l'inflammation, le plus ancien évolutivement confère une immunité innée. Les cellules myéloïdes qui le

constituent, principalement les monocyte/macrophage possèdent des récepteurs pour un nombre restreint de « motifs moléculaires » conservés par de nombreux micro-organismes également appelés « patterns moléculaires associés aux pathogènes ou PAMP ». Ces cellules reconnaissent les composants bactériens, viraux, parasitaires et peuvent ainsi les détruire. Puisque ces cellules sont nombreuses et d'emblée fonctionnelles, la réponse immunitaire innée est immédiate et conduite par des médiateurs préformés « les récepteurs aux PAMP ou PRR » présents sous formes cellulaires ou solubles. Parmi les PRR on retrouve les anticorps naturels, certaines protéines du complément, et des récepteurs de surface cellulaire parmi lesquels la famille des récepteurs éboueurs des macrophages, également impliqués dans l'absorption des lipoprotéines modifiées, et la famille des récepteurs Toll-like receptor, TLR. Ces récepteurs déclenchent une cascade intracellulaire de signalisation complexe qui stimule la production de médiateurs inflammatoires. La réponse immunitaire innée est caractérisée par la reconnaissance d'une diversité limitée de structures de l'ordre de plusieurs centaines.

La plaque d'athérome est une source de soi modifié qui mime des structures pathogènes (PAMP)

Les facteurs de risque traditionnels des maladies cardiovasculaires (hypercholestérolémie, diabète, hypertension, facteurs hémodynamiques locaux) sont à l'origine d'une dysfonction endothéliale focalisée, d'une accumulation des lipoprotéines contenant l'apoB piégés dans l'intima artérielle et du recrutement de monocytes. Ces éléments contribuent à une réaction inflammatoire chronique non résolutive. Les facteurs chimio-attractants produits par les cellules de l'intima artérielle en réponse à l'inflammation locale vont induire le recrutement successif de diverses populations de leucocytes. Et en premier lieu, ce sont les monocytes différenciés en macrophages dans les tissus qui vont grâce aux protéines et aux récepteurs spécifiques de l'immunité innée (PRR), pouvoir potentiellement résoudre l'inflammation et faire régresser les lésions précoces

Pour citer cet article : Pirault J, Lesnik P. Immuno-inflammation dans l'athérosclérose. OCL 2011 ; 18(1) : 27-30. doi : 10.1684/ocl.2011.0364

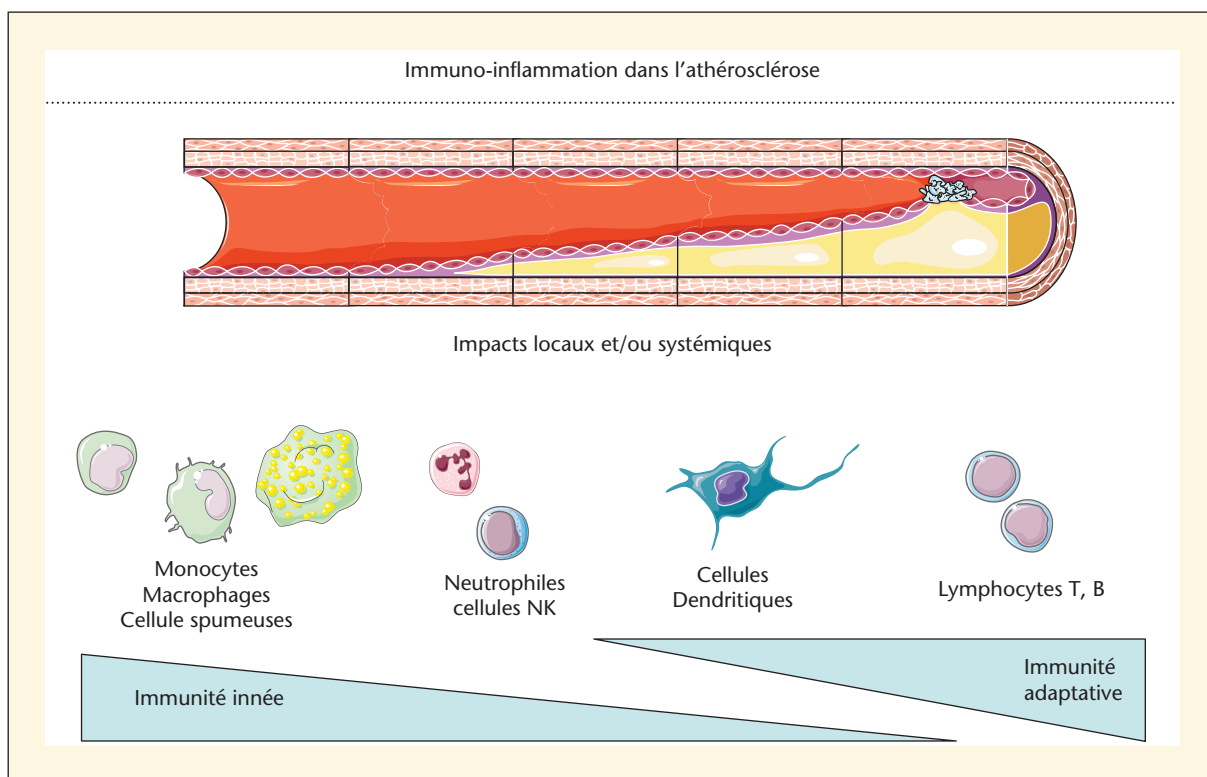


Figure 1. Immuno-inflammation dans l'athérosclérose.

d'athérosclérose. Ces macrophages se gorgent de lipoprotéines modifiées et notamment de cholestérol, l'estérifient pour neutraliser les effets potentiellement cytotoxiques et proapoptotiques du cholestérol libre. Cependant, l'accumulation des stimuli pro-inflammatoires pro-oxydants et pro-apoptotiques favorise la mort des macrophages et la formation de débris apoptotiques. Dans les plaques d'athérome avancées, l'élimination des débris apoptotiques par les phagocytes, est moins efficace, générant ainsi la nécrose post-apoptique et encore plus d'inflammation.

Le déficit de nettoyage crée du « soi » modifié

Dans la plaque d'athérome évolutive, de multiples mécanismes d'oxydation génèrent des radicaux libres des lipides oxydés hautement réactifs qui vont modifier de manières covalentes les composants cellulaires ou extracellulaires de l'intima et être associé à l'apparition de nouvelles structure moléculaires. Ces épitopes sont susceptibles d'être reconnus par le système immunitaire

inné ou adaptatif. En effet, ces structures peuvent avoir une grande homologie avec les PAMP exogènes et être reconnue par les récepteurs PRR de la branche innée de l'immunité. Il peut donc y avoir une compétition de ces structures qui miment les PAMP exogènes vis-à-vis des PRR. Cette compétition peut générer des réponses variées :

- (1) une réponse inflammatoire mimant une infection exogène ;
- (2) une saturation des PRR qui ne peuvent assurer l'élimination des « signaux de danger » tels que les débris apoptotiques. Les cellules et débris apoptotiques sont un réservoir de structures immunogènes et de lipides oxydés ressemblant aux PAMP.

Action de la réponse spécifique : immunité adaptative

Le second système immunitaire apparu plus récemment dans l'échelle de l'évolution confère une immunité dite adaptative. Les lymphocytes qui le constituent possèdent un répertoire

de récepteurs capables de reconnaître spécifiquement un nombre presque illimité de structures et notamment des épitopes présents sur les produits d'oxydation des LDL. Ces néo-antigènes du soi sont captés et dégradés par les cellules dendritiques immatures qui sondent continuellement leur environnement à la recherche d'antigènes. Certains fragments dérivants des LDL oxydées sont associés aux molécules d'histocompatibilité pour être présenté aux lymphocytes T. Cette présentation nécessite la maturation des cellules dendritiques et l'expression de molécules de co-stimulations dont le profil d'expression est conditionné par l'environnement cellulaire et cytokinique. Dans ce contexte, l'immunité innée coopèrent avec l'immunité acquise, contribuant à créer un environnement de cytokines en réponse aux interactions entres PAMP et PRR. L'intégration des signaux portés par ces cytokines va participer à la polarisation de la réponse immune. Ainsi, le contexte local inflammatoire de capture et de présentation des néo-antigènes par les cellules dendritiques va être associé à la production de différents sous-types de lymphocytes

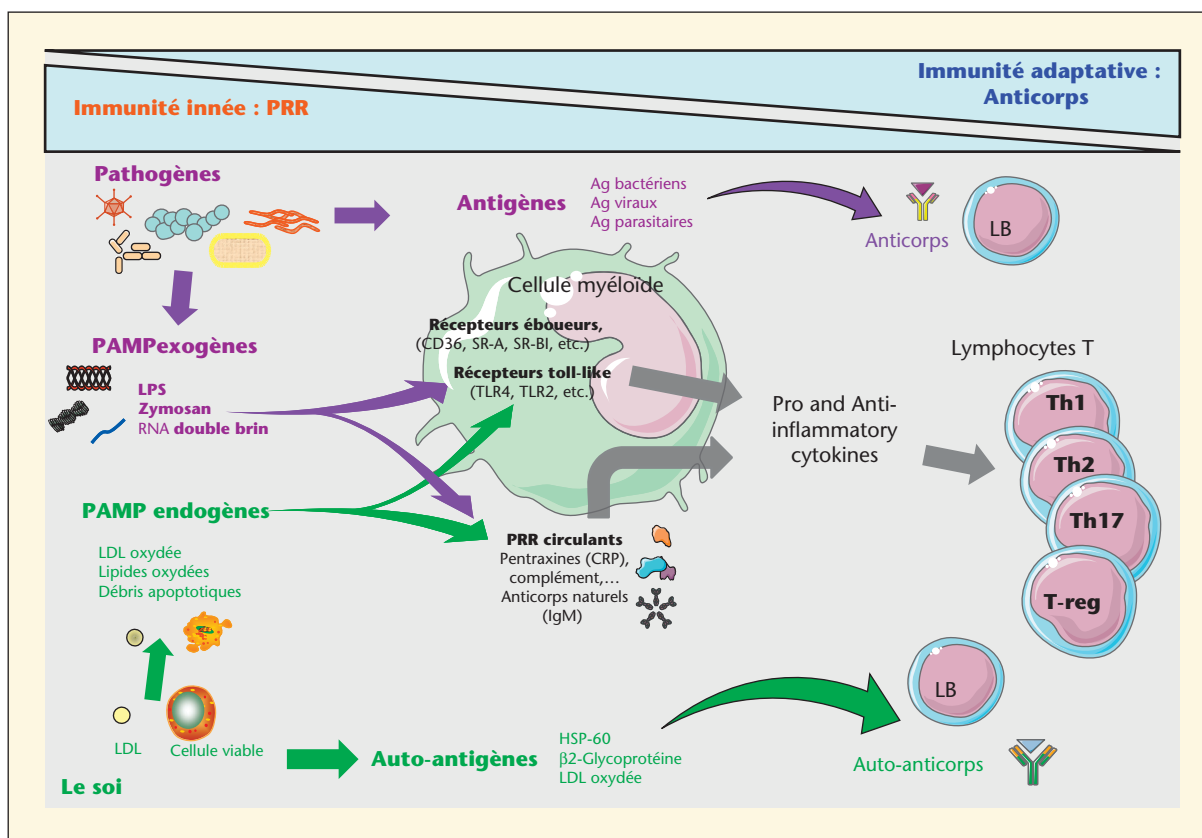


Figure 2. Vue d'ensemble des interactions entre les pathogènes exogènes et signaux de dangers endogènes et les récepteurs PRR cellulaires ou circulants portées par les cellules myéloïdes (macrophages et cellules dendritiques). Intégration des signaux inflammatoires pour générer une réponse immunitaire adaptative tolérigène ou immunogène contre les antigènes ou néoantigènes.

T dont certains génèrent des réponses pro-athérogène (Th-1, NK-T), protectrice (T-reg) ou encore indéterminée (Th-17, Th-2, Th3). Comprendre cette complexité de la réponse immune qui

peut se polariser vers une réponse tolérigène ou bien immunogène et un enjeu majeur de recherche, et ouvre la voie à la vaccination contre certains néo-épitopes athérogènes. L'immuni-

sation de modèles animaux avec des LDL oxydées a d'ailleurs démontré son efficacité pour inhiber la progression de l'athérosclérose expérimentale. De même, d'autres études expérimentales

Tableau 1. Immuno-inflammation dans l'athérosclérose.

	Immunité innée	Immunité adaptative
Populations cellulaires	Neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques et cellules NK	Lymphocytes
Spécificité	Ligands conservés (PAMP) affinité faible	Antigène spécifique affinité forte
Diversité	Limité aux PAMP	Très large
Mémoire	Non	Oui
Auto-réactivité (condition physiologique)	Non	Non
Auto-réactivité (condition pathologique)	Oui : PAMP endogènes	Oui : auto-anticorps
Protéines associées	PRR, anticorps naturels et complément	Anticorps, récepteurs Fc
Rapidité de la réponse	Immédiate	Retardée

démontrent le caractère athéroprotecteur de la réponse humorale soutenue par les lymphocytes B.

Les réponses immunitaires innée et adaptative sont intrinsèques au processus d'athérosclérose

On peut considérer que la plaque d'athérome est une source continue de production de « structures endogènes modifiées » ou « de signaux de dangers » qui normalement sont efficacement éliminés par le système immunitaire. Cependant, lorsque ces signaux sont trop intenses et/ou récurrents, des « structures moléculaire endogènes » analogues aux « PAMP exogènes » produisent, d'un côté, une réponse inflammatoire chronique (immunité innée) et, de l'autre, les

nouveaux épitopes immunogènes une auto réactivité (immunité adaptative). L'athérosclérose apparaît donc aujourd'hui comme une pathologie immuno-inflammatoire non résolutive.

POUR EN SAVOIR PLUS

1. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2010 ; 134 : 33-46.
2. Binder CJ, Hartvigsen K, Witztum JL. Promise of immune modulation to inhibit atherogenesis. *J Am Coll Cardiol* 2007 ; 50 : 547-50.
3. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009 ; 27 : 165-97.
4. Getz GS. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Bridging the innate and adaptive immune systems. *J Lipid Res* 2005 ; 46 : 619-22.
5. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-ed-

ged sword. *Nat Rev Immunol* 2006 ; 6 : 508-19.

6. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol* 2006 ; 1 : 297-329.
7. Hartvigsen K, Chou MY, Hansen LF, et al. The role of innate immunity in atherogenesis. *J Lipid Res* 2009 ; 50 (Suppl.) : S388-93.
8. Kaplan MJ. Management of cardiovascular disease risk in chronic inflammatory disorders. *Nat Rev Rheumatol* 2009 ; 5 : 208-17.
9. Mallat Z, Tedgui A. Immunomodulation to combat atherosclerosis : the potential role of immune regulatory cells. *Expert Opin Biol Ther* 2004 ; 4 : 1387-93.
10. Nilsson J, Hansson GK. Autoimmunity in atherosclerosis: a protective response losing control? *J Intern Med* 2008 ; 263 : 464-78.
11. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis : pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006 ; 86 : 515-81.
12. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 802-15.

2. Annexe 2 Article: Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis.

Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis

Emmanuel L. Gautier, Thierry Huby, Flora Saint-Charles, Betty Ouzilleau, John Pirault, Virginie Deswaerte, Florent Ginhoux, Elizabeth R. Miller, Joseph L. Witztum, M. John Chapman and Philippe Lesnik

Circulation published online Apr 20, 2009;

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.807537

Circulation is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circ.ahajournals.org>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.108.807537/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation* is online at
<http://circ.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis

Emmanuel L. Gautier, PhD; Thierry Huby, PhD; Flora Saint-Charles, MSc; Betty Ouzilleau, BS; John Pirault, MSc; Virginie Deswaerte, MSc; Florent Ginhoux, PhD; Elizabeth R. Miller, BS; Joseph L. Witztum, MD; M. John Chapman, PhD, DSc; Philippe Lesnik, PhD

Background—Immunoinflammatory mechanisms are implicated in the atherogenic process. The polarization of the immune response and the nature of the immune cells involved, however, are major determinants of the net effect, which may be either proatherogenic or antiatherogenic. Dendritic cells (DCs) are central to the regulation of immunity, the polarization of the immune response, and the induction of tolerance to antigens. The potential role of DCs in atherosclerosis, however, remains to be defined.

Methods and Results—We created a mouse model in which the lifespan and immunogenicity of conventional DCs are enhanced by specific overexpression of the antiapoptotic gene *hBcl-2* under the control of the CD11c promoter. When studied in either low-density lipoprotein receptor–deficient or apolipoprotein E–deficient backgrounds, *DC-hBcl2* mice exhibited an expanded DC population associated with enhanced T-cell activation, a T-helper 1 and T-helper 17 cytokine expression profile, and elevated production of T-helper 1–driven IgG2c autoantibodies directed against oxidation-specific epitopes. This proatherogenic signature, however, was not associated with acceleration of atherosclerotic plaque progression, because expansion of the DC population was unexpectedly associated with an atheroprotective decrease in plasma cholesterol levels. Conversely, depletion of DCs in hyperlipidemic CD11c–diphtheria toxin receptor/apolipoprotein E–deficient transgenic mice resulted in enhanced cholesterolemia, thereby arguing for a close relationship between the DC population and plasma cholesterol levels.

Conclusions—Considered together, the present data reveal that conventional DCs are central to the atherosclerotic process, because they are directly implicated in both cholesterol homeostasis and the immune response. (*Circulation*. 2009;119:2367-2375.)

Key Words: atherosclerosis ■ immune system ■ homeostasis ■ dendritic cells ■ lymphocytes

Dendritic cells (DCs) are the most potent antigen-presenting cells. Indeed, DCs possess a markedly elevated capacity to stimulate T cells, B cells, and natural killer T cells and to drive T-cell differentiation along both T-helper 1 (Th1) and T-helper 2 (Th2) pathways.¹ Moreover, DCs are known to favor tolerance to antigens, possibly via the generation of regulatory T cells.² As major regulators of immune responses and T-cell polarization, DCs are potentially key players in chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis. Indeed, available evidence suggests that immune responses are directly implicated in the pathogenesis of atherosclerosis.^{3,4} Although the presence of DCs has been reported in atherosclerotic plaques,^{5–7} no mechanistic insight into the potential central immunoregulatory role of DCs in the immunoinflammatory dimension of

atherosclerosis has been provided in atherosclerosis-prone mice. Modulation of the capacity of DCs to induce an immune response may facilitate evaluation of their impact on the pathogenesis of atherosclerosis. Indeed, enhancement of the lifespan of DCs has been reported to increase their immunogenicity in mice.^{8–11} In this context, it is especially relevant that Bcl-2 has been shown to be a major regulator of DC lifespan and immunogenicity.¹² We therefore developed a mouse model in which DC lifespan and immunogenicity are enhanced by overexpression of human Bcl-2 (*hBcl-2*) under the control of the DC-specific CD11c promoter. This experimental approach allowed us to modulate the half-life and thus the immunogenicity of DCs in vivo with a view to evaluate their impact on the immune response during atherosclerosis.

Received July 15, 2008; accepted March 6, 2009.

From INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié (E.L.G., T.H., F.S.-C., B.O., J.P., V.D., M.J.C., P.L.), Paris, France; Université Pierre et Marie Curie, Université Paris 06, UMR-S 939 (E.L.G., T.H., F.S.-C., B.O., J.P., V.D., M.J.C., P.L.), Paris, France; Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme (T.H., M.J.C., P.L.), Paris, France; Department of Medicine, University of California San Diego (E.R.M., J.L.W.), La Jolla, Calif; and Department of Gene and Cell Medicine and Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine (F.G.), New York, NY.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCULATIONAHA.108.807537/DC1>.

Correspondence to Dr Philippe Lesnik, INSERM U939, Hôpital de la Pitié, 83 Bd de l'hôpital, 75651 Paris 13, France. E-mail philippe.lesnik@upmc.fr
© 2009 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.807537

Clinical Perspective p 2375

Methods

Transgenic mice expressing hBcl-2 under the murine CD11c promoter were described previously.¹³ All procedures (bone marrow transplantation, plasma lipid analyses, chimerism, quantification of atherosclerotic plaques, immunohistochemistry, quantification of autoantibodies, analysis of gene expression by quantitative polymerase chain reaction, flow cytometry, cytokine assays, and generation of bone marrow–derived DCs) were performed as described previously^{13–16} and are detailed in the online-only Data Supplement, along with details about the animal model.

Statistical Analysis

The statistical significance of the differences between groups was evaluated with the unpaired or paired 2-tailed Student *t* test. *P*<0.05 was considered significant. Values are expressed as mean±SEM.

Results**Characterization of *DC-hBcl2* Mice**

Because CD11c is differentially expressed by DC subpopulations, and to gain insight into the specificity of transgene expression, we assessed the expression of hBcl-2 in DC subpopulations and in different types of leukocytes (online-only Data Supplement Figure I). Flow cytometric analysis revealed that splenic conventional DCs (CD11c^{high}, MHCII⁺), comprising CD11b⁺ DCs (CD11c^{high}, CD11b⁺) and CD8⁺ DCs (CD11c^{high}, CD8⁺), expressed hBcl-2, whereas plasmacytoid DCs (CD11c^{int}, PDCA-1⁺) did not. Equally, we demonstrated that splenic B cells, T cells, and macrophages did not express hBcl-2. Another population of leukocytes known to express CD11c, bronchoalveolar macrophages (CD11c⁺, F4/80⁺), did not express hBcl-2 in the *DC-hBcl-2* mice in the present study (online-only Data Supplement Figure I). This finding may be explained by the nature of the CD11c promoter used, which is a minimal promoter previously described to drive expression only in DCs with high endogenous expression of CD11c.¹⁷ In our model, monocytes (CD11b⁺, F4/80⁺) did not express hBcl-2, and therefore, monocyte count was similar in control apolipoprotein E–deficient (*Apoe*^{−/−}) mice and *DC-hBcl-2 Apoe*^{−/−} mice (online-only Data Supplement Figure II).

***hBcl-2* Overexpression in DCs Enhances Their Lifespan and Immunogenicity**

DCs generated from bone marrow cells of *DC-hBcl-2* mice expressed hBcl-2 protein as expected (online-only Data Supplement Figure IIIA) and displayed enhanced resistance to apoptotic stress (online-only Data Supplement Figure IIIB). Such enhanced survival impacted the relative number of DCs in vivo. Indeed, the DC population was enriched in spleens from *DC-hBcl-2* mice (online-only Data Supplement Figure IIIC; *P*<0.05). Then, because DCs may control lymphocyte homeostasis, we assessed T-cell activation in splenocytes of *DC-hBcl-2* and control mice at the basal state. The data revealed that activated T cells, CD3⁺ and CD4⁺ cells expressing the activation marker CD69, were significantly increased in *DC-hBcl-2* mice compared with controls (online-only Data Supplement Figure IIID; *P*<0.01 and *P*<0.001, respectively), whereas expression of CD25 by CD4⁺ T cells

was similar in both groups in the basal state (online-only Data Supplement Figure IIID). These data are consistent with an enhanced immunogenicity of DCs in *DC-hBcl-2* mice fed a chow diet. In this regard, it is relevant that on a nonlethal lipopolysaccharide challenge, we reported that *DC-hBcl-2* mice equally exhibited significant elevation in the DC population, as well as in activation of T and B cells, compared with their littermate controls.¹⁴ Collectively, *hBcl-2* overexpression in DCs prolonged their lifespan, led to a significant increase in the DC population, and enhanced T-cell activation in vivo.

Effect of Enhanced DC Lifespan and Immunogenicity on T-Cell Activation in *Ldl-r*^{−/−} Mice

To evaluate whether DC lifespan and immunogenicity impact both immunity and atherogenesis, irradiated female low-density lipoprotein (LDL) receptor–deficient (*Ldl-r*^{−/−}) mice were reconstituted with bone marrow cells from *DC-hBcl-2* mice or wild-type (WT) littermates. After 4 weeks of recovery, mice were switched to a Western diet for 12 weeks. The efficiency of transplantation was established by the detection of <5% of *Ldl-r* knockout alleles in bone marrow cells from these mice (online-only Data Supplement Figure IV), thereby indicating a chimerism in the range of 95% to 100%.

We first evaluated the impact of enhancement of DC lifespan on the DC population itself and on T-cell activation and Th1 polarization. DCs were enriched in the spleens of *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} compared with *wt*→*Ldl-r*^{−/−} mice (+56%, *P*<0.01; Figure 1A). Analysis of splenic T cells revealed an elevation in the proportion of both CD3⁺ and CD4⁺ T cells expressing the activation marker CD69 (*P*<0.0001 for each) and of CD4⁺ T cells expressing CD25 (+25%, *P*<0.01) in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} compared with controls (Figure 1B). Concomitantly, an increment of 20% in the percentage of CD44-expressing CD4⁺ memory T cells was observed in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} mice compared with *wt*→*Ldl-r*^{−/−} mice (*P*<0.0001; Figure 1C). We next quantified the mRNA expression of key mediators of DC function, as well as T-cell responses and polarization in the spleen. Analysis of the expression of genes characteristic of DC function revealed a significant increase in the mRNA of interleukin (IL)-12p40, IL-23p19, and IL-15 in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} mice, whereas expression of the IL-12p35 and IL-18 genes was unchanged (Figure 1D). This was associated with enhanced expression of interferon (IFN)-γ and TIM-3 (T-cell immunoglobulin- and mucin-containing molecule, a transcription factor promoting Th1 development), together with unchanged levels of GATA3 mRNA (a transcription factor promoting Th2 development) in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} mice (Figure 1E). Expression levels of classic inflammatory genes revealed elevated levels of IL-1β mRNA but similar levels of CD40L and tumor necrosis factor-α mRNAs in the spleens of *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{−/−} mice compared with controls (Figure 1E). These findings support the contention that an enhanced DC lifespan leads to elevation in DC immunogenicity and increased T-cell activation with polarization toward a Th1 profile.

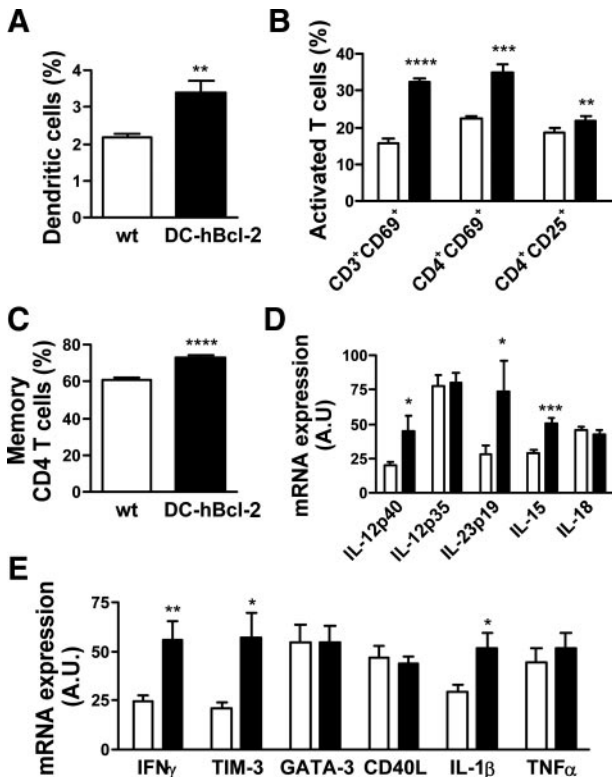


Figure 1. *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice exhibited greater DC abundance, enhanced T-cell activation, and elevated immunostimulatory cytokine expression. Percentages of CD11c^{high} DCs (A), activated CD3⁺ CD69⁺, CD4⁺ CD69⁺, and CD4⁺ CD25⁺ T cells (B), and memory CD4⁺ CD44⁺ T cells (C) were determined in spleens from *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice by flow cytometry. D and E, Levels of mRNA expression of functional markers in DCs were evaluated by quantitative polymerase chain reaction in spleens from *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice. A.U. indicates arbitrary units; TNF α , tumor necrosis factor- α . **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, and *****P*<0.0001.

Effect of Enhanced DC Lifespan and Immunogenicity on Regulatory T Cells in *Ldl-r*^{-/-} Mice

Natural regulatory T cells (Treg) exhibit marked antiatherogenic properties¹⁸ as a consequence of their ability to counteract both Th1- and Th2-mediated immune responses. Because DCs might influence the content and function of regulatory T cells, we evaluated whether the Treg population was modified in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice. As shown in Figure 2A, flow cytometric analysis revealed that spleen CD4⁺ Foxp3⁺ and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells were similar in both groups, thereby arguing for the absence of an altered natural Treg population. We next quantified the expression of key markers of Treg cell population and function in the spleens of both groups of mice. Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis confirmed the unaltered Foxp3 expression consistent with the absence of elevation in the natural Treg population. In this context, it was relevant that expression levels of transforming growth factor- β and CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) were similar in splenic cells of both *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 2B). By contrast, a marked 7-fold increment in IL-10 mRNA expres-

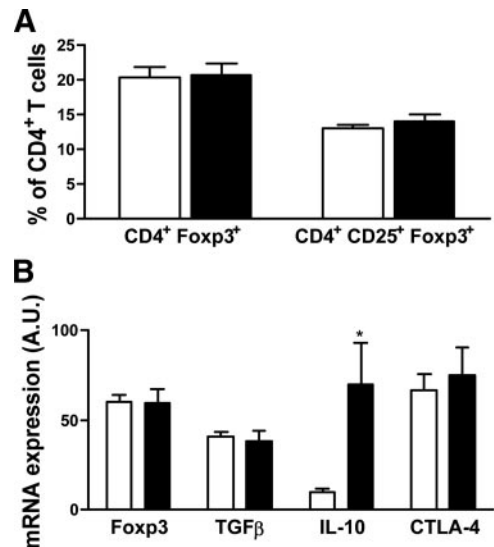


Figure 2. Regulatory T-cell content and expression of associated genes in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice. A, Flow cytometric analysis of gated CD4⁺ mouse splenocytes expressing FoxP3 or FoxP3 and CD25. B, Levels of mRNA expression of functional markers of regulatory response in spleens from *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice. A.U. indicates arbitrary units; TGF β , transforming growth factor- β . **P*=0.01.

sion was observed in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 2B; *P*=0.01). Overall, these data indicate that Treg cells are not markedly altered in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice.

Effect of Enhanced DC Lifespan and Immunogenicity on B-Cell Activation and Circulating Levels of Autoantibodies Against Oxidation-Specific Epitopes in *Ldl-r*^{-/-} Mice

Several recent studies have emphasized the protective role of B lymphocytes in atherosclerosis.^{15,19,20} These findings led us to question whether the increment in the DC population in our mouse model might affect levels of antibodies directed against oxidation-specific epitopes, the titer of the atheroprotective EO6 antibody idotype, and the polarization of the humoral response (Th2-driven IgG1 versus Th1-driven IgG2c/IgG3 isotype production). We first evaluated B-cell activation by measuring the proportion of B cells bearing the activation marker CD86. A minor increment in B-cell activation was observed in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 3A; *P*<0.05). Quantification of anti-malondialdehyde-LDL and anti-oxidized LDL IgG1, IgG2c, IgG3, and IgM antibody production revealed significant elevation in the IgG2c fraction of both anti-MDA-LDL and anti-oxidized LDL antibodies (2-fold; Figure 3B and 3C; *P*<0.0005 for each) in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with control mice, whereas levels of IgG1, IgG3, and IgM fractions were comparable between groups (Figure 3B and 3C). Moreover, titers of the EO6 antibody were markedly elevated in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 3D; *P*<0.0005). In conclusion, the increment in IgG2c titer in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice, which is characteristic of a Th1-driven immune response, is consistent

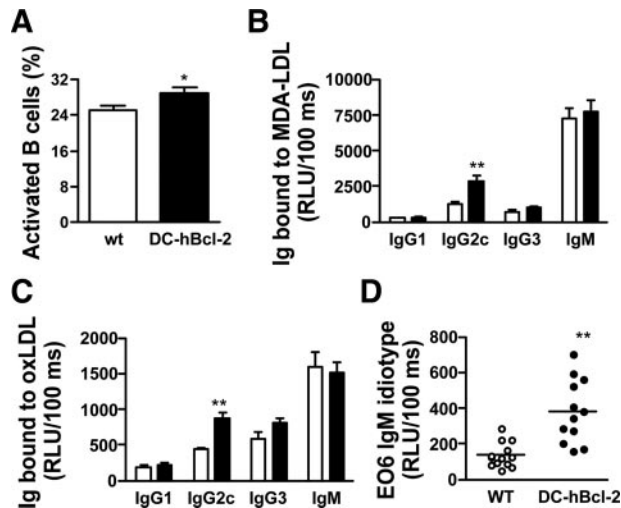


Figure 3. B-cell activation, production of autoantibodies, and E06 levels in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice. A, Percentage of activated B cells (CD19⁺ CD69⁺) was determined in spleens from *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice by flow cytometry. Serum titers of IgG1, IgG2c, IgG3, and IgM antibodies that bind malondialdehyde (MDA)-LDL (B), or copper-oxidized (Ox)-LDL (C), and phosphorylcholine-specific (E06) antibodies were detected by isotype-specific ELISA (D). RLU indicates relative light units. **P*<0.05 and ***P*<0.0005.

with the cytokine expression profile observed in the spleens of these animals and indicates that expansion of the DC population favors Th1 polarization in an atherogenic environment.

Effect of DC Lifespan on Atherosclerotic Lesion Progression, Plasma Lipids, and Lipoprotein Profile in *Ldl-r*^{-/-} Mice

The impact of enhanced DC lifespan and immunogenicity on the progression of atherosclerosis was evaluated in *DC-hBcl-2* transgenic and control mice on an *Ldl-r*-deficient background. As shown in Figure 4A, the lesion area in the aortic root of *Ldl-r*^{-/-} recipients reconstituted with *DC-hBcl-2* marrow cells was unchanged compared with their wild-type reconstituted controls after 12 weeks of Western diet (247.0±17.1×10³ μm² versus 294.9±26.0×10³ μm², respectively; *P*=0.2). Furthermore, macrophage areas were comparable in lesions of *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 4B; *P*=0.5). Because lesion formation and progression are predominantly dependent on plasma cholesterol levels and its distribution among the different lipoprotein subclasses, we then assessed whether elevated numbers of DCs might alter cholesterol homeostasis. Compared with controls, *Ldl-r*^{-/-} mice transplanted with *DC-hBcl-2* bone marrow cells displayed a significant reduction in plasma total cholesterol (547±61 versus 426±64 mg/dL, respectively; *P*<0.005) and in free cholesterol levels (198±45 versus 149±33 mg/dL, respectively; *P*<0.05); by contrast, triglyceride levels were similar in both groups of mice (192±48 versus 170±42 mg/dL, respectively; Table). Analysis of cholesterol distribution among plasma lipoprotein subclasses revealed that the lower total cholesterol level in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} compared with *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice was due to a

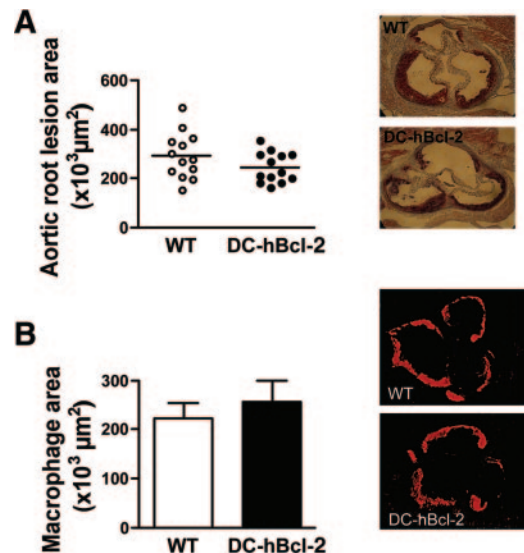


Figure 4. Quantification of atherosclerotic lesion surface and macrophage areas in *Ldl-r*-deficient mice. A, The degree of atherosclerosis was determined by oil red O staining of aortic root sections of *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice after 12 weeks of Western diet. Each symbol represents mean area in a single mouse; horizontal bar indicates mean value for the respective group. B, Lesions were immunostained for the macrophage CD68 antigen, and the degree of macrophage accumulation was determined.

reduction in the abundance of VLDL and LDL subclasses (−59% and −57%, respectively), whereas the HDL fraction was decreased to a lesser degree (−33%; Figure 5A). Because a larger DC population in *DC-Bcl-2* animals was associated with lower circulating cholesterol levels, thereby revealing that the role of DC is important in the setting of hypercholesterolemia, we sought to determine whether the opposite mechanism (ie, acute depletion of DCs) was associated with an enhanced degree of cholesterolemia. We took advantage of the DT receptor (*DTR*)/diphtheria toxin (DT)

Table. Body Weight and Lipid Parameters

Study	Wild-Type	<i>DC-hBcl-2</i>	<i>P</i>
Bone marrow transplantation in <i>Ldl-r</i> ^{-/-} mice, n	13	14	
Weight, g	19.7±1.1	19.6±1.3	0.89
Total cholesterol, mg/dL	547±61	426±63	<0.001
Free cholesterol, mg/dL	198±45	149±33	<0.02
Triglycerides, mg/dL	192±48	170±42	0.34
<i>Apoe</i> ^{-/-} background, chow diet	n=12	n=10	
Weight, g	21.2±0.4	20.9±.3	0.23
Total cholesterol, mg/dL	370±7	317±18	<0.01
Free cholesterol, mg/dL	121±4	102±6	<0.01
Triglycerides, mg/dL	79±6	87±9	0.60
<i>Apoe</i> ^{-/-} background, Western diet, n	8	13	
Weight, g	19.8±0.5	20.7±0.3	0.12
Total cholesterol, mg/dL	686±65	509±19	<0.005
Free cholesterol, mg/dL	196±18	156±4	<0.05
Triglycerides, mg/dL	79±17	97±10	0.41

Values are expressed as mean±SEM unless otherwise indicated.

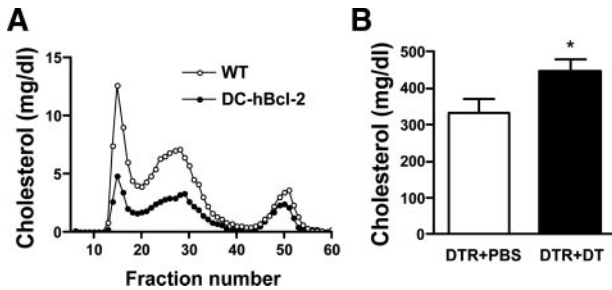


Figure 5. DCs modulate plasma cholesterol and lipoprotein profile in *Ldl-r*-deficient mice. **A**, Cholesterol distribution across the VLDL, LDL, and HDL lipoprotein classes was analyzed by gel filtration in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} and *wt*→*Ldl-r*^{-/-} mice after 12 weeks of Western diet. **B**, *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice were treated with PBS or diphtheria toxin (DT) to induce DC depletion. Plasma total cholesterol was determined in both groups. **P*<0.05.

system, which allows depletion of DCs after DT injection in transgenic mice expressing *DTR* under the *CD11c* promoter.²¹ First, *Ldl-r*^{-/-} mice were irradiated, transplanted with *CD11c-DTR* bone marrow cells, and submitted to a 4-week recovery period. These mice were fed a Western diet for 2 weeks, and then half of the mice were injected with DT whereas the other half were treated with vehicle. Plasma total cholesterol level was measured 24 hours after treatment (Figure 5B) and revealed an increment of 34% in *CD11c-DTR*→*Ldl-r*^{-/-} mice treated with DT compared with vehicle-treated animals (333±36 versus 446±32 mg/dL, respectively; *P*<0.05).

Effect of DC Lifespan and Immunogenicity on Immune Response in *Apoe*^{-/-} Mice

We next evaluated whether the impact of DC lifespan and immunogenicity on immunity that we documented in *Ldl-r*^{-/-} mice, and more especially that which involved T-cell activation and B-cell responses, was equally manifest in an alternative atherosclerotic model (ie, *Apoe*^{-/-} mice). We first showed that the DC population was significantly expanded in chow-fed 20-week-old *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice compared with *Apoe*^{-/-} controls (Figure 6A; *P*<0.05). Flow cytometric analysis revealed that both the CD3⁺- and CD4⁺-activated T-cell populations were larger in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice than in controls (Figure 6B; *P*<0.001 each), whereas the CD25-expressing CD4⁺ T-cell population was unaltered (Figure 6B). With regard to the B-cell compartment, no change was observed in CD86 expression by B cells in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice compared with controls (Figure 6C). The main alteration in the antibody response observed on the *Ldl-r*^{-/-} background (ie, elevation in circulating levels of both anti-malondialdehyde-LDL and anti-oxidized LDL IgG2c antibodies in *DC-hBcl-2* mice) was equally observed on an *Apoe*^{-/-} background (Figure 6D and 6E; *P*<0.05), whereas no statistically significant differences were observed for the other isotypes. Finally, levels of the E06 antibody were not affected in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice compared with controls. To further evaluate whether changes in the polarization of the immune response observed in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} were equally present in the *Apoe*^{-/-} background, additional experiments were conducted in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} mice fed a Western diet. We thus confirmed activation of key

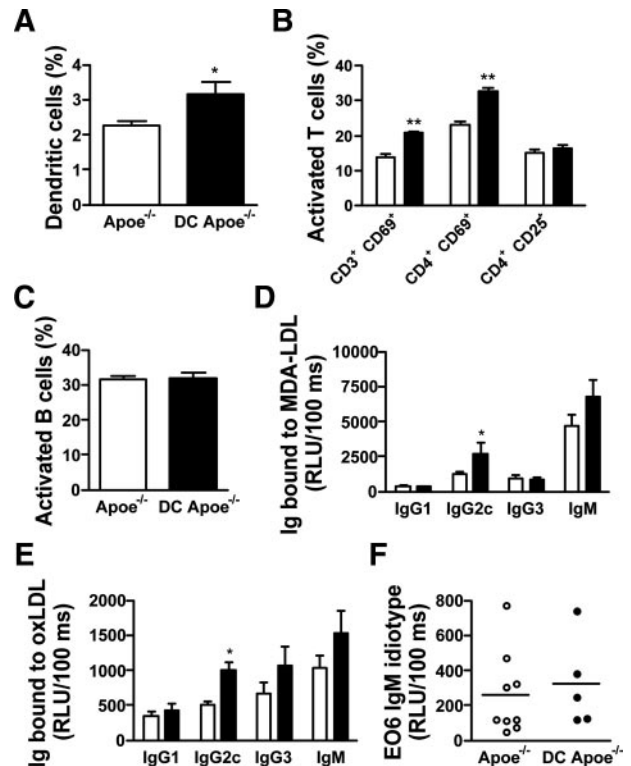


Figure 6. Immune system activation in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice and in *Apoe*^{-/-} mice. Percentages of DCs (**A**), activated T cells (**B**), and activated B cells (**C**) were determined in spleens from *Apoe*^{-/-} and wild-type mice by flow cytometry. Serum titers of modified-LDL-specific IgG1, IgG2c, IgG3, and IgM antibodies that bind malondialdehyde (MDA)-LDL (**D**), copper-oxidized (Ox)-LDL (**E**), and phosphorylcholine-specific (E06) antibodies (**F**) were detected by isotype-specific ELISA. RLU indicates relative light units. **P*<0.05 and ***P*<0.001.

mediators of DC function and T-cell responses in the spleen of *DC-hBcl-2* in this background (ie, IL-12p40 and IL-23p19 mRNAs; online-only Data Supplement Figure VA). In addition, we characterized the regulatory response in the *Apoe*^{-/-} background and confirmed the absence of an effect on natural Treg (nTreg) as shown by the absence of major changes in the expression of key genes involved in nTreg function and development (CD25, GITR, ICOS, neuropilin-1, and Drosha; online-only Data Supplement Figure VB). Although a major increase in IL-10 mRNA levels was observed in spleens of *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice (Figure 2B), a trend for higher IL-10 mRNA levels in Western diet-fed-*DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice was detectable (online-only Data Supplement Figure VA). However, in assays of restimulated splenocytes, CD4⁺ T cells from *DC-hBcl-2* mice produced significantly more IL-10 than control CD4⁺ T cells, whereas DCs from *DC-hBcl-2* mice produced less IL-10 than controls (Figure 7A and 7B). Such data suggest that changes in DC function and population are associated with increased production of IL-10 by CD4⁺ T cells, most likely T regulatory type-1 (Tr-1) T cells. Finally, we observed a 4.2-fold increase in the percentage of CD4⁺IL-17⁺ cells compared with control *Apoe*^{-/-} mice in restimulated splenocytes (Figure 7C). Moreover, intracellular staining for IL-12 and IFN-γ in CD4⁺ T cells (Figure 7D and 7E) confirmed the Th1 signature, which indicates that

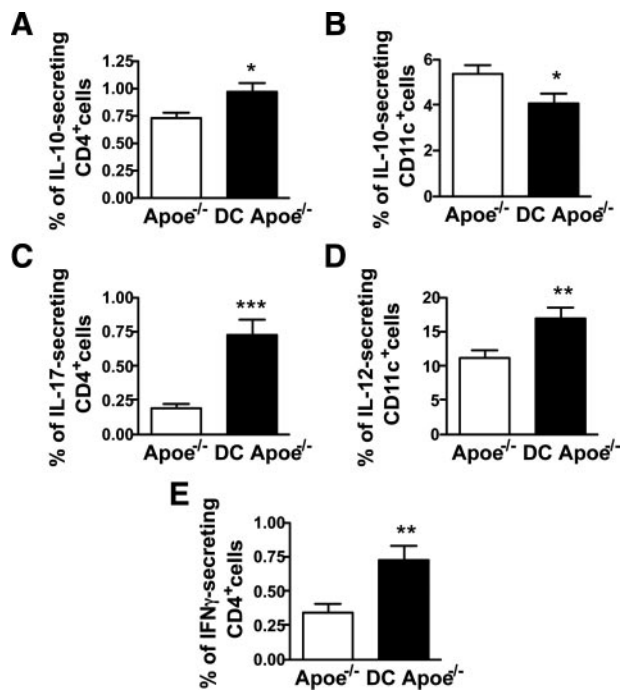


Figure 7. Intracellular staining for specific cytokines of CD11c⁺ and CD4⁺ splenocytes stimulated with lipopolysaccharide. Splenocytes from *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} (n=16) and *Apoe*^{-/-} (n=15) mice fed a Western diet for 4 to 9 weeks were stimulated for 15 hours with lipopolysaccharide. A–E, Flow cytometric analysis of gated CD4⁺ (A, C, E) and CD11c⁺ (B, D) mouse splenocytes expressing IL-10 (A and B), IL-17 (C), IL-12p40 (D), and IFN-γ (E). **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.0001.

both Th1 and Th17 phenotypes were upregulated in our model.

In conclusion, the main changes in immune system activation observed on the *Ldl-r*^{-/-} background (ie, enhanced Th1 activation along with Th1-driven IgG2c anti-oxidized LDL and anti-malondialdehyde-LDL production) were equally present on an *Apoe*^{-/-} background. Additionally, we observed an increase in the activity of the Th17 pathway and a potential increase in Tr-1 regulatory T cells.

Effect of DC Lifespan and Immunogenicity on Atherosclerotic Lesion Progression, Plasma Lipids, and Lipoprotein Profile in *Apoe*^{-/-} Mice

We analyzed lesion area in chow-fed 20-week-old *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} mice and reported the absence of a significant difference between the 2 groups of animals (Figure 8A; 149.5±20.9 versus 181.4±17.5×10³ μm², respectively; *P*=0.3). Moreover, comparison of plaque burden in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} mice fed a Western diet for 8 weeks revealed no difference in lipid deposition between groups (Figure 8B; 184.1±21.7 versus 247.4±35.3×10³ μm², respectively; *P*=0.13). Taken together, and despite marked elevation in T-cell activation and a Th1-polarized immune response in *DC-hBcl-2* mice compared with controls, no significant difference in lesion areas was found between groups. On the contrary, we observed a consistent trend toward attenuated lesion progression in *DC-hBcl-2* mice compared with controls in all mouse models studied. We next compared plasma lipid levels in *Apoe*^{-/-} and *DC-hBcl-2*

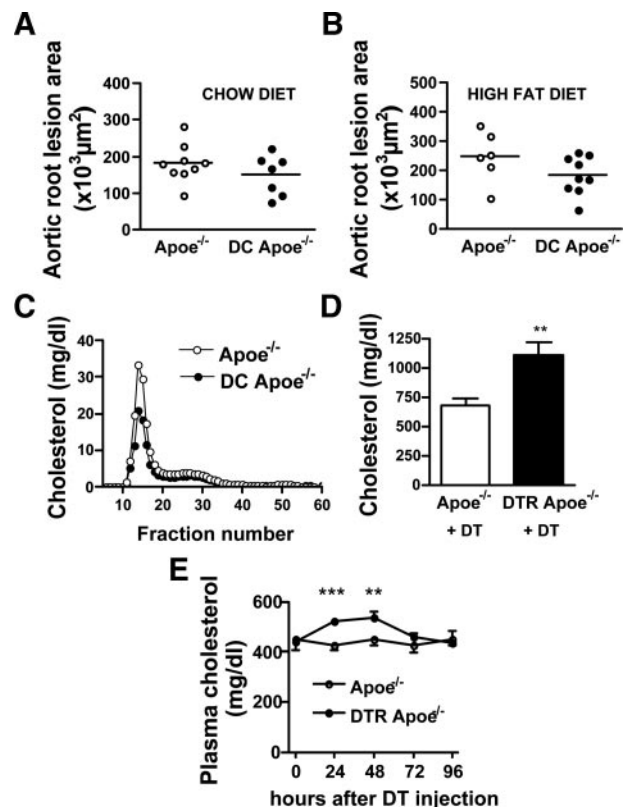


Figure 8. Quantification of atherosclerotic lesion surface, modulation of plasma cholesterol levels, and lipoprotein cholesterol profiles in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} mice. The degree of atherosclerosis was determined by oil red O staining of aortic root sections from chow-fed 20-week-old *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice and *Apoe*^{-/-} controls (A) and from *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice and *Apoe*^{-/-} controls fed a Western diet for 8 weeks (B). Each symbol represents mean lesion area in a single mouse; horizontal bar indicates mean value for the respective group. C, Cholesterol distribution across VLDL, LDL, and HDL lipoprotein classes was analyzed by gel filtration in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} and *Apoe*^{-/-} mice fed a Western diet for 8 weeks. D, DC depletion was achieved by DT injection in *CD11c-DTR Apoe*^{-/-} mice fed a Western diet, and plasma total cholesterol was determined and compared with *Apoe*^{-/-} controls injected with DT. E, Time course of changes in plasma cholesterol levels in DT-treated *Apoe*^{-/-} and *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice maintained on a chow diet; values represent mean±SEM of 5 to 6 mice per group. Statistically significant differences between *CD11c-DTR Apoe*^{-/-} and control groups: **P*=0.01, ***P*<0.01, ****P*<0.0001. Unpaired (A, B, and D) and paired (E) 2-tailed Student *t* tests were used.

Apoe^{-/-} fed either a chow or a Western diet and observed that plasma total and free cholesterol levels were significantly decreased in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice compared with controls in both conditions, whereas triglyceride levels were unchanged (Table). Analysis of cholesterol distribution among plasma lipoprotein classes in *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} animals fed the Western diet revealed a reduction in the cholesterol content of particles in the size range of both VLDL and LDL (−37% and −22%, respectively; Figure 8C). It is interesting to note that we did not observe such changes in plasma lipid levels in *DC-Bcl-2* mice on a wild-type background maintained on a chow diet (online-only Data Supplement Figure VI).

To confirm whether depletion of DCs in the *Apoe*^{-/-} background would also result in an increase in cholesterol

levels as seen in the *LDL-r*-deficient background (Figure 5B), cholesterol-fed *CD11c-DTR Apoe^{-/-}* mice and *Apoe^{-/-}* controls were injected with DT. An increment of 63% in plasma cholesterol concentration was observed in DT-treated *CD11c-DTR Apoe^{-/-}* mice compared with DT-treated *Apoe^{-/-}* controls after 24 hours (1102 ± 110 versus 676 ± 64 mg/dL, respectively, $P=0.01$; Figure 8D). Next, we analyzed the time course of changes in plasma cholesterol levels in another set of *CD11c-DTR Apoe^{-/-}* mice fed a normal chow and observed a transient increase (Figure 8E) that was statistically significant 24 and 48 hours after DT injection. This time course is consistent with published data on the duration of CD11c-positive cell depletion in DT treated-*CD11c-DTR* mice.²¹ Such depletion was specific to conventional DCs and did not affect plasmacytoid DCs (online-only Data Supplement Figure VII). Considered together, these results reveal that modulation of conventional DC number impacts plasma cholesterol levels under conditions of hypercholesterolemia.

Discussion

A central question in the pathogenesis of atherosclerosis concerns the potential impact of DCs. Although DCs are present in human and murine atherosclerotic lesions,⁵⁻⁷ a paucity of experimental data exists on the role of DCs in atherosclerotic plaque progression. Therefore, we designed genetically modified mouse models to address this question. For this purpose, we examined the relationship between DC lifespan and progression of atherosclerosis and made several novel findings: (1) The extended lifespan of DCs impacts on T-cell activation status and polarization of the immune response toward the Th1 pathway; (2) DCs markedly alter the degree of cholesterolemia in mice; and (3) the hypocholesterolemic action of DCs compensates for the proatherogenic Th1 response, thereby resulting in the absence of modification in atherosclerotic lesion size in *DC-hBcl-2* mice compared with controls.

DCs undergo accelerated clearance from lymphoid organs after interaction with antigen-specific T cells,²² which indirectly indicates that their lifespan may influence the duration of their ability to stimulate lymphocytes. Indeed, in several mouse models in which apoptosis of DCs was inhibited (including overexpression of p35 or deletion of Bim), enhanced DC lifespan was associated with expansion of the DC population and enhanced immunogenicity, as revealed by a major impact on T-cell activation.^{9,10} This is consistent with the increase in CD25⁺, CD69⁺, and CD44⁺ CD4 T cells we observed in *DC-hBcl-2* mice. Moreover, in our model, we observed that DCs profoundly modulated both IL-12p40 and thereby IFN- γ expression. Such activated T cells and Th1 cytokines are proatherogenic, because they promote both lesion progression and plaque destabilization.^{4,23} Moreover, we showed that IL-12p35 expression was not altered in *DC-hBcl-2* in either the *Ldl-r^{-/-}* or the *Apoe^{-/-}* background, whereas IL-23p19 mRNA levels were markedly elevated. Because the IL-12p40 subunit is common to both IL-12 (which is formed of the p40 and p35 subunits) and IL-23 (formed of the p40 and p19 subunits), such an expression profile is consistent with a marked increase in activity of the

IL-23 pathway and suggests that the effect of DCs on immune system activation may also involve the IL-23 axis. This recently discovered pathway has been shown to drive the differentiation of Th17 cells, which are known to be triggers of autoimmune-driven inflammation.²⁴ Interestingly, we report activation of the Th17 pathway in our model. Nevertheless, to date, this pathway has not been implicated in plaque progression but might represent another proatherogenic arm of the immune system.

DCs had similarly been known to favor tolerance to antigens, and several studies suggest that this process may involve the generation of regulatory T cells.^{2,25} In this context, we examined whether in atherosclerotic-prone mice, DCs may be critical for maintaining immune tolerance through their impact on the regulatory T-cell population. Treg cells are of particular importance in atherosclerosis, because recent evidence suggests that they are associated with protection against atherogenesis.^{18,26} In an atherosclerotic context, we found no significant changes in the percentage of the splenic natural Treg population (CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺) in *DC-hBcl-2* mice, consistent with previous studies showing that DC lifespan and immunogenicity did not alter the natural Treg compartment.^{9,10} Nevertheless, expression of IL-10 mRNA was upregulated in the spleen of *DC-hBcl-2* $\rightarrow$ *Ldl-r^{-/-}* compared with control mice, and IL-10-producing CD4⁺ T cells were increased in the spleen of *DC-hBcl-2 Apoe^{-/-}* mice. Such enhancement would predict protection against lesion development, as suggested by studies in which the IL-10 axis was modulated.²³ Moreover, expansion of CD4⁺ IL-10⁺ T cells, also termed Tr-1 cells or adaptive Tregs, could exert an antiatherogenic effect in our model. Indeed, this specific T-cell compartment has been described as a potent antiatherogenic population that may help to combat Th1 proatherogenic bias.²⁷

Th2 or Th1 responses are associated with an immunoglobulin class switching to IgG1 or IgG2c, respectively.^{28,29} We therefore quantified titers of serum antibodies directed against oxidation-specific epitopes. Statistically significant increases occurred in titers of anti-malondialdehyde-LDL IgG2c and anti-oxidized LDL IgG2c in *DC-hBcl-2* mice on *Ldl-r*- or *Apoe*-deficient backgrounds, which corroborates the development of a Th1 bias immune response in these mice observed at the level of cytokine expression (IFN- γ , IL-12, IL-15, and TIM-3).

As a major result of the present study, we unexpectedly observed that elevation in the DC population led to markedly decreased plasma cholesterol levels in both the *Ldl-r^{-/-}* and *Apoe^{-/-}* backgrounds. Using a mouse model that allowed a reverse approach (ie, specific depletion of DCs), we observed that conventional DC elimination induced elevation in plasma cholesterol levels, thereby arguing that conventional DCs may contribute to correction of hyperlipidemia and that such cells may be implicated in cholesterol homeostasis. Interestingly, the impact of expansion of the DC population on plasma cholesterol levels is consistent with other observations in both mice and humans supporting a role for mononuclear phagocytes (macrophages, DCs, and Kupffer cells) in cholesterol homeostasis. For example, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, a key factor for DC growth

and differentiation,³⁰ has been reported to exhibit a cholesterol-lowering effect in patients with aplastic anemia,³¹ a finding later confirmed in rabbits³² and in patients with coronary artery disease.³³ Similarly, the hematopoietic growth factor macrophage colony-stimulating factor was also reported to lower cholesterol levels in rabbits and nonhuman primate models.^{34,35} In mice, the opposite effect was observed in the *op/op* strain mutated for macrophage colony-stimulating factor, in which monocytes and tissue macrophage populations such as Kupffer cells are reduced.³⁶ Indeed, when bred on an *Apoe*^{-/-} background, the *op/op Apoe*^{-/-} mice present a 3-fold increase in cholesterol levels.³⁷ Considered together, these data indicate a strong relationship between the mononuclear phagocyte system and the potential control of cholesterol homeostasis. In the present study, we report for the first time the implication of conventional DCs as a cell type able to favor cholesterol lowering in a hyperlipidemic environment. The precise mechanisms that underlie the decrement in plasma cholesterol levels in our mouse model were not explored in the framework of the present study; however, because they are present in many tissues (spleen, liver, gut, and intestine), DCs might favor lipoprotein uptake and clearance from the circulation. Of note, Stoneman et al³⁸ reported no significant change in cholesterol levels in *CD11b-DTR Apoe*^{-/-} mice treated with DT. In this latter model, DT-induced CD11b⁺ cell depletion was restricted to monocyte/macrophages, neutrophils, and CD11b⁺ conventional DCs, thereby indicating that depletion of these myeloid cells does not reproduce the effect observed on cholesterol levels in the *CD11c-DTR Apoe*^{-/-} mice in the present study.

In addition to the role of DCs in facilitating a Th1-polarized immune response, the prevailing paradigm that underlies the proatherogenic effects of T cells, the present study revealed that the size of the conventional DC population was closely associated with regulation of cholesterol homeostasis. Overall, these antagonistic responses balanced each other out, with a null effect on atherosclerotic plaque progression. Clearly then, our findings identify the DC as a key player in atherosclerosis through its impact on both immune response regulation and cholesterol homeostasis.

Sources of Funding

This work was funded by INSERM, Fondation de France, Leducq Foundation, and National Institutes of Health HL086559 (Dr Witztum). Dr Gautier was supported by a Fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. Drs Lesnik, Huby, and Chapman are recipients of "Contrat d'Interface" from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris/INSERM.

Disclosures

None.

References

- Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621–667.
- Groux H, Fournier N, Cottrez F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004;16:99–106.
- Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, Witztum JL. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*. 2002;8:1218–1226.

- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508–519.
- Bobryshev YV, Taksir T, Lord RS, Freeman MW. Evidence that dendritic cells infiltrate atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Histol Histopathol*. 2001;16:801–808.
- Moos MP, John N, Grabner R, Nossman S, Gunther B, Vollandt R, Funk CD, Kaiser B, Habenicht AJ. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2386–2391.
- Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185–194.
- Nopora A, Brouck T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol*. 2002;169:3006–3014.
- Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, Wang J. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*. 2006;311:1160–1164.
- Chen M, Huang L, Wang J. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood*. 2007;109:4360–4367.
- Park D, Laptev N, Seethamagari M, Slawin KM, Spencer DM. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol*. 2006;24:1581–1590.
- Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004;5:583–589.
- Gautier EL, Huby T, Ouzilleau B, Doucet C, Saint-Charles F, Gremy G, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1625–1631.
- Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxin shock. *J Immunol*. 2008;180:6941–6946.
- Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2004;114:427–437.
- Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*. 2009;119:1795–1804.
- Sapoznikov A, Fischer JA, Zaft T, Krauthgamer R, Dzionek A, Jung S. Organ-dependent in vivo priming of naive CD4⁺, but not CD8⁺, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*. 2007;204:1923–1933.
- Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdoy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*. 2006;12:178–180.
- Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest*. 2002;109:745–753.
- Major AS, Fazio S, Linton MF. B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1892–1898.
- Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002;17:211–220.
- Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood*. 2002;100:1734–1741.
- Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86:515–581.
- Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2006;18:670–675.
- Steinman R. Ralph Steinman: pioneering new perspectives on the immune system and infectious diseases. Interviewed by Marilynn Larkin. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:383–386.
- van Puijvelde GH, van Es T, van Wanrooij EJ, Habets KL, de Vos P, van der Zee R, van Eden W, van Berkel TJ, Kuiper J. Induction of oral

- tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2677–2683.
27. Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2003;108:1232–1237.
 28. Toellner KM, Luther SA, Sze DM, Choy RK, Taylor DR, MacLennan IC, Acha-Orbea H. T helper 1 (Th1) and Th2 characteristics start to develop during T cell priming and are associated with an immediate ability to induce immunoglobulin class switching. *J Exp Med.* 1998;187:1193–1204.
 29. Martin RM, Brady JL, Lew AM. The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods.* 1998;212:187–192.
 30. Hanada K, Tsunoda R, Hamada H. GM-CSF-induced in vivo expansion of splenic dendritic cells and their strong costimulation activity. *J Leukoc Biol.* 1996;60:181–190.
 31. Nimer SD, Champlin RE, Golde DW. Serum cholesterol-lowering activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *JAMA.* 1988;260:3297–3300.
 32. Ishibashi T, Yokoyama K, Shindo J, Hamazaki Y, Endo Y, Sato T, Takahashi S, Kawarabayashi Y, Shiomi M, Yamamoto T. Potent cholesterol-lowering effect by human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rabbits: possible implications of enhancement of macrophage functions and an increase in mRNA for VLDL receptor. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1534–1541.
 33. Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C. Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1636–1642.
 34. Shimano H, Yamada N, Motoyoshi K, Matsumoto A, Ishibashi S, Mori N, Takaku F. Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). *Ann N Y Acad Sci.* 1990;587:362–370.
 35. Stoudemire JB, Garnick MB. Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on plasma cholesterol levels. *Blood.* 1991;77:750–755.
 36. Witmer-Pack MD, Hughes DA, Schuler G, Lawson L, McWilliam A, Inaba K, Steinman RM, Gordon S. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci.* 1993;104(pt 4):1021–1029.
 37. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997;150:1687–1699.
 38. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, Bennett M. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res.* 2007;100:884–893.

CLINICAL PERSPECTIVE

In healthy and pathological tissues, dendritic cells (DCs) are the most effective cells to present antigens and to initiate immune responses. DCs have an elevated capacity to stimulate T lymphocytes, natural killer lymphocytes, and B lymphocytes. Thus, they represent a potential tool for vaccination or immunotherapy in infectious disease, cancers, transplant rejection, autoimmune diseases, and immunoinflammatory diseases. During atherogenesis, immunoinflammatory mechanisms contribute to the progression of atherosclerotic lesions; however, the precise role of DCs in the progression of atherosclerosis and related cardiovascular disease is indeterminate. To address this question, we created transgenic mice in which the lifespan of DCs was increased in response to elevated resistance to apoptosis (CD11c-hBcl2) on the one hand, and on the other, we used mice in which targeted depletion of DCs (CD11c-DTR [diphtheria toxin receptor]) could be achieved. The present data provide the first in vivo evidence that DCs profoundly and broadly impact immune responses in atherosclerosis and, unexpectedly, circulating cholesterol levels, a major cardiovascular risk factor. The impact of DCs on cholesterolemia level is relevant to data published in preclinical and clinical studies using granulocyte-macrophage colony stimulating factor, a well-known DC growth factor. Indeed, granulocyte-macrophage colony stimulating factor induced a reduction in circulating cholesterol levels in treated patients. Considered together, the potential role of DCs as a central regulator of both immunity and cholesterol homeostasis opens new therapeutic horizons in the treatment of atherosclerosis.

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Conventional Dendritic Cells at the Crossroads between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis.

EL. Gautier; T Huby; F Saint-Charles; B Ouzilleau; J Pirault; V Deswaerte; F Ginhoux; ER. Miller; JL Witztum; M.J Chapman and P Lesnik.

SUPPLEMENTAL METHODS

Transgenic DC-hBcl-2 mice

The hBcl-2 cDNA from the pORF-hBcl-2 plasmid (Invivogen) was cloned downstream of the mouse dendritic cell-specific promoter CD11c^{1, 2} (up to -821 bp from the ATG codon) amplified from a mouse C57BL/6 BAC clone (BAC PAC Resources). The linearized transgenic construct was injected into C57BL/6 fertilized female pronuclei, and progeny positive for the transgene was crossed with C57BL/6 mice³.

Animals and bone marrow transplantation

For bone marrow transplantation, *Ldl-r^{-/-}* mice on the C57BL/6 background were supplied from Jackson Laboratories and bred in house. Female *Ldl-r^{-/-}* mice (8-9-week-old) were subjected to medullar aplasia with 10 Gray lethal total body irradiation as previously described³. The next day, femurs were isolated from donor *DC-hBcl-2* or *wt* mice and 2.5 x 10⁶ bone marrow cells were injected intravenously into irradiated mice (100% C57BL/6) to rescue their haematopoietic systems. These mice were then housed in cages under air-filtered

conditions for 4 weeks in order to allow reconstitution of their haematopoietic system, after which they were fed a Western diet consisting of 0.15% cholesterol and 20% saturated fat for 12 weeks. Equally, *DC-hBcl-2* mice were crossed with *Apoe*^{-/-} mice on the C57BL/6 background supplied from Charles River. *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} mice and *Apoe*^{-/-} littermates were fed either a chow diet to 20 weeks of age, or 6 week-old animals were switched to a Western diet consisting of 0.15% cholesterol and 20% saturated fat for 8 weeks. To deplete the DC population *in vivo*, we crossbred *CD11c-DTR* transgenic mice (100% C57BL/6)⁴ with *Apoe*^{-/-} mice. Mice were injected intraperitoneally with either PBS or diphtheria toxin (DT, 4ng/g) as previously described⁴. All animal procedures were performed with accreditation from the French Government and under strict compliance with Animal Welfare Regulations.

Assessment of chimerism.

Genomic DNA from bone marrow cells was isolated using the Nucleospin DNA Kit (Macherey Nagel). Chimerism was evaluated by quantification of the amount of *Ldl-r* ko DNA in both *wt*→*Ldl-r*^{-/-} and *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice by polymerase chain reaction. PCR was performed using 100 ng of DNA per reaction. The specific primers used were as follows: *Ldl-r ko* forward primer 5'-CCATATGCATCCCCAGTCTT-3' and *Ldl-r ko* reverse primer 5'-AATCCATCTTGTTCAATGGCCGATC-3'. Amplification products obtained were compared to define a ratio of DNA from *wt* mice diluted in DNA from *Ldl-r*^{-/-} mice ranging from 0 to 50% in order to determine the level of chimerism.

Plasma lipid analyses and determination of lipoprotein profiles.

Blood samples were collected following an overnight fast. Plasma total cholesterol, free cholesterol and triglyceride concentrations were measured by enzymatic colorimetric assays as previously described⁵. Plasma lipoproteins were fractionated by gel filtration on two

Superose 6 columns (Amersham Biosciences) connected in series using a BioLogic DuoFlow Chromatography System (BioRad) ⁵.

Analysis of atherosclerotic plaques and immunohistochemistry.

Mice were sacrificed under isoflurane anesthesia and perfused with sterile ice-cold PBS. Hearts were collected, fixed in 10% formalin solution for 30 minutes followed by overnight incubation in a PBS/20% sucrose solution at 4°C and then embedded in Tissue-Tek OCT compound. Atherosclerotic lesions were quantified through the aortic root using Oil Red O staining as previously described ⁶. Briefly, approximately 60 sections, 10 µm thick, were cut through the proximal aorta. Every tenth section was stained with Oil Red O for 4 hours and then counterstained with Mayer haematoxylin for 1 minute. The extent of atherosclerosis was measured with color thresholding to delimit areas of ORO staining. For immunohistochemistry, aortic root cryosections were air-dried and fixed in 10% formalin for 30 minutes. Sections were then blocked for 60 minutes with 3% BSA in PBS and then incubated with anti-CD68 antibody (Serotec, 1:300) or control antibody overnight at 4°C. After washing, a biotinylated goat anti-rat Ig secondary antibody was added and the signal was enhanced using the tyramide signal amplification kit (Perkin Elmer) according to the manufacturer's protocol; sections were subsequently counterstained for nuclei with DAPI.

Flow cytometry analysis.

At sacrifice, splenocytes were harvested, minced and filtered through a 70-µm cell strainer. After red cell lysis in hypotonic buffer, cells were resuspended in PBS/1% BSA, pre-incubated for 5 min with Fc blocker and then incubated for 30 min at 4°C with antibodies directed against either CD45 (clone 30F11, Miltenyi), CD3 (clone 145-2C11, BD Pharmingen), CD4 (clone GK1.5, Miltenyi), CD11c (clone N418, eBiosciences), CD19 (clone

6D5, eBiosciences), Gr-1 (clone RB6-8C5, eBiosciences), PDCA-1 (clone JF05-1C2.4.1, Miltenyi); CD69 (clone H1.2F3, eBiosciences), CD44 (clone IM7, eBiosciences), CD25 (clone 7D4, Beckman Coulter), CD86 (clone GL1, eBiosciences), IL10 (clone JES5-16E3, eBiosciences), IL12p40 (clone C17.8, eBiosciences), IFN γ (clone XMG-1, eBiosciences), IL17 (clone TC11-18H101, BD Pharmingen), or Foxp-3 (clone FJK-16s, eBiosciences) in order to analyse the proportions of diverse splenocyte subpopulations. Cells were analysed on a FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter) using CXP software. For single cell staining, splenocytes were isolated and cultured for 5 h or 15 hours in complete medium containing LPS (1 μ g/ml) and Brefeldin A. Intracellular staining was performed with a fixation and permeabilization kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of gene expression by quantitative real time PCR (Q-PCR).

RNAs were prepared using TRIzol reagent (Invitrogen) from frozen tissue specimens isolated from mice at sacrifice. Each RNA preparation was hybridized with random hexamer (Promega) and reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Quantitative real time PCR was performed using a LightCycler PCR System (Roche) as previously described^{3,5}. *Hprt* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) was used as a housekeeping gene in order to account for variability in the initial quantities of cDNA. Expression data were based on the crossing points calculated from the LightCycler data analysis software and corrected for PCR efficiencies of both the target and the reference gene.

Quantification of anti-MDA LDL, anti-oxLDL and EO6 antibodies.

Oxidatively modified-LDL-specific antibodies were determined as described^{7,8}. Wells were coated with either malondialdehyde-LDL (MDA-LDL) or copper-oxidized-LDL (oxLDL) at 5 μ g/ml in PBS-EDTA. Sera were diluted 1:100 and binding of IgM, IgG1, IgG2c and IgG3 to

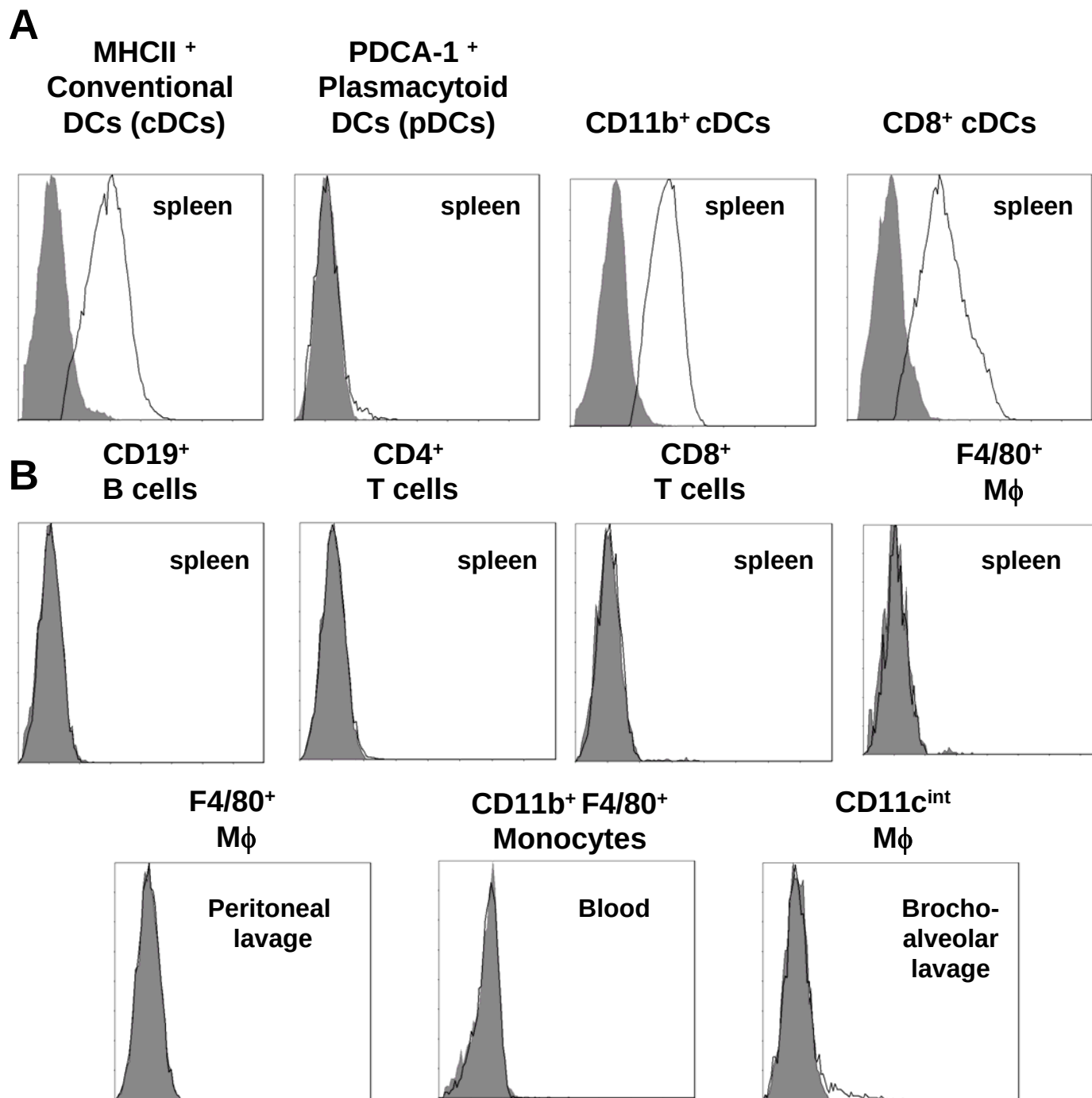
wells coated with antigens was detected by chemiluminescent enzyme immunoassays using alkaline phosphatase (AP)-labeled secondary antibodies and the substrate LumiPhos (Lumigen). For the measurement of serum T15 clonotypic (EO6) antibodies, a double antibody capture assay was used. Wells were coated with 2 µg/ml monoclonal anti-T15-idiotypic antibody AB1-2 (ATCC). Sera were diluted 1:100 and binding of T15 clonotypic IgM antibodies was detected by using 0.1µg/ml biotinylated AB1-2 followed by alkaline phosphatase-labeled NeutrAvidin and the substrate LumiPhos. For all measurements, luminescence was determined using a Dynatech luminometer (Dynex Technologies) and antibody binding was measured as relative light units (RLUs) measured over 100 ms.

Generation of bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs)

BMDCs were generated as described by previously ⁹. Briefly, at day 0, bone marrow cells were seeded at 2×10^6 per 100 mm dish in 10 ml complete R10 medium (RPMI 1640 supplemented with Penicillin -100 U/ml-, Streptomycin -100 µg/ml-, L-glutamine -2 mM-, 2-mercaptoethanol -50 µM-, 10% heat-inactivated FCS and 20 ng/ml mGM-CSF). At day 3, another 10 ml R10 medium were added to the plates. At days 6 and 8, half of the culture supernatant volume was collected and centrifuged. Subsequently, the cell pellet was resuspended in 10 ml fresh R10 medium and transferred back to the original plate. Cells were used at day 10.

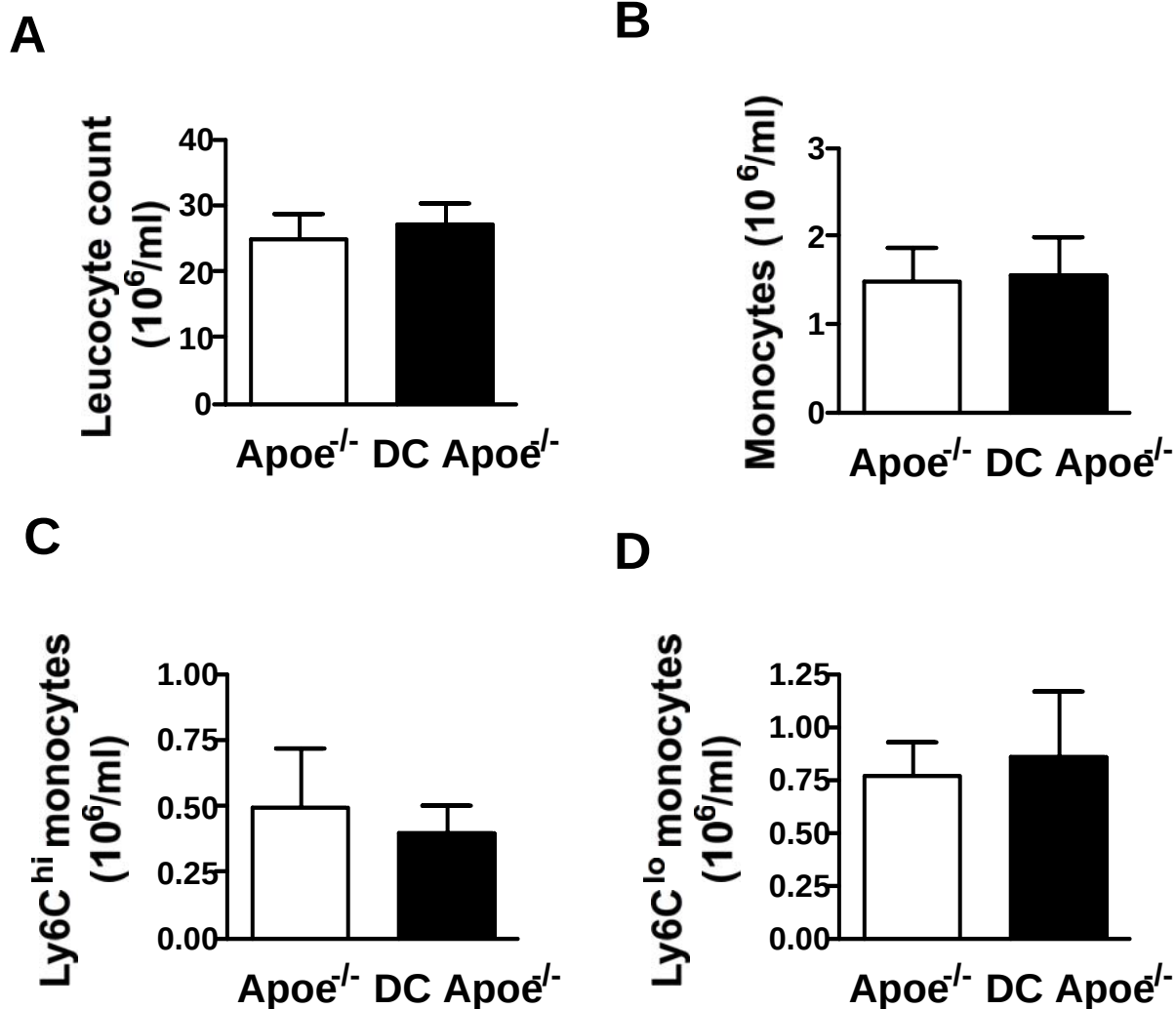
Statistical analysis.

The statistical significance of the differences between groups was evaluated using the two-tailed Student t-test; $P < 0.05$ was considered significant. Values are expressed as mean $\pm$ SEM.



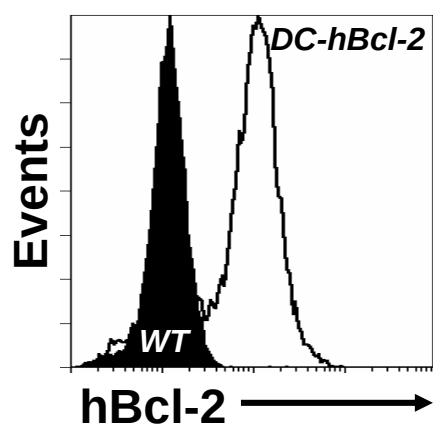
hBcl-2 

Supplementary Figure I. hBcl-2 expression in different cell types of the immune system. The shaded profile represents wt mice and the open profile *DC-hBcl-2* mice. Intracellular staining of hBcl-2 was performed in splenic dendritic cells isolated using anti-CD11c antibody-coated magnetic beads (A). Other specific leucocyte (CD45⁺) populations in spleen, peritoneal lavage, lung and blood were identified by combinations of cell-specific antibodies (B).

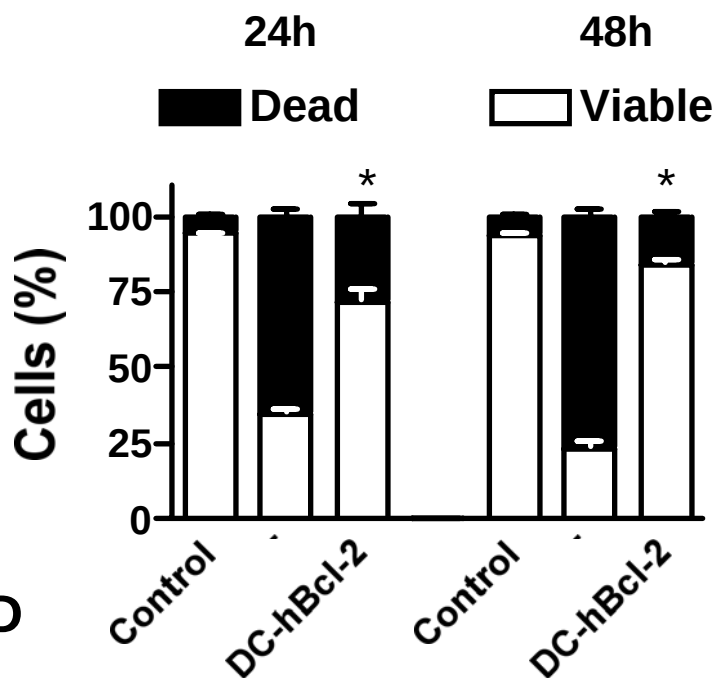


Supplementary Figure II. Blood leucocyte and monocyte counts in *DC Apoe*^{-/-} mice fed a Western diet. Circulating leucocyte (A), monocyte (CD115⁺) (B, Ly6C^{hi} (Gr1^{hi}) monocytes (C), and Ly6C^{lo} (Gr1^{lo}) monocyte (D) numbers.

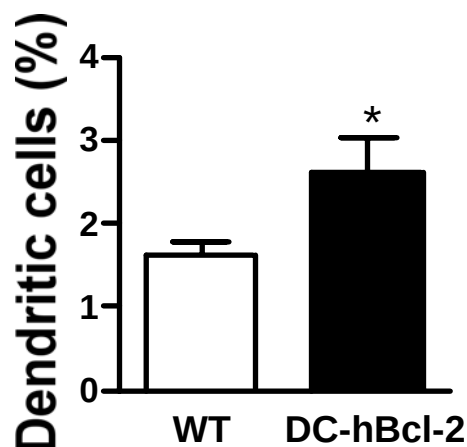
A



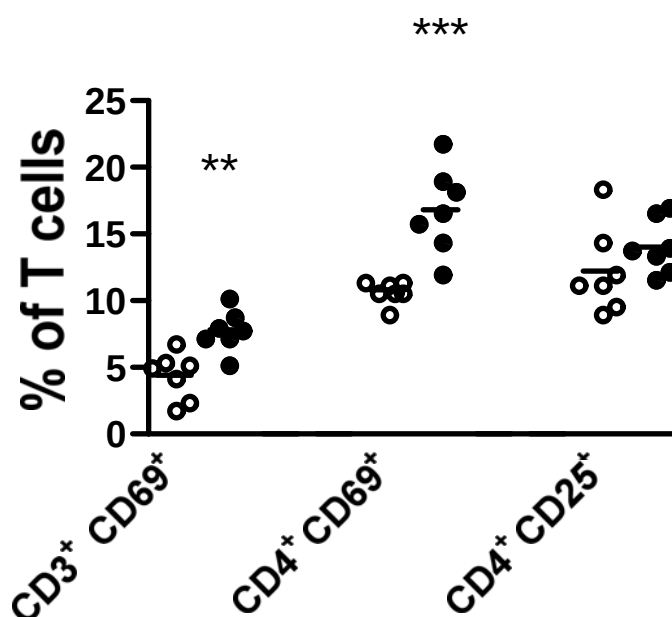
B



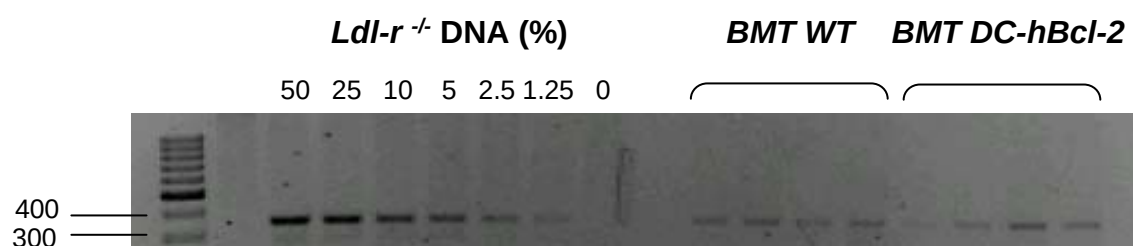
C



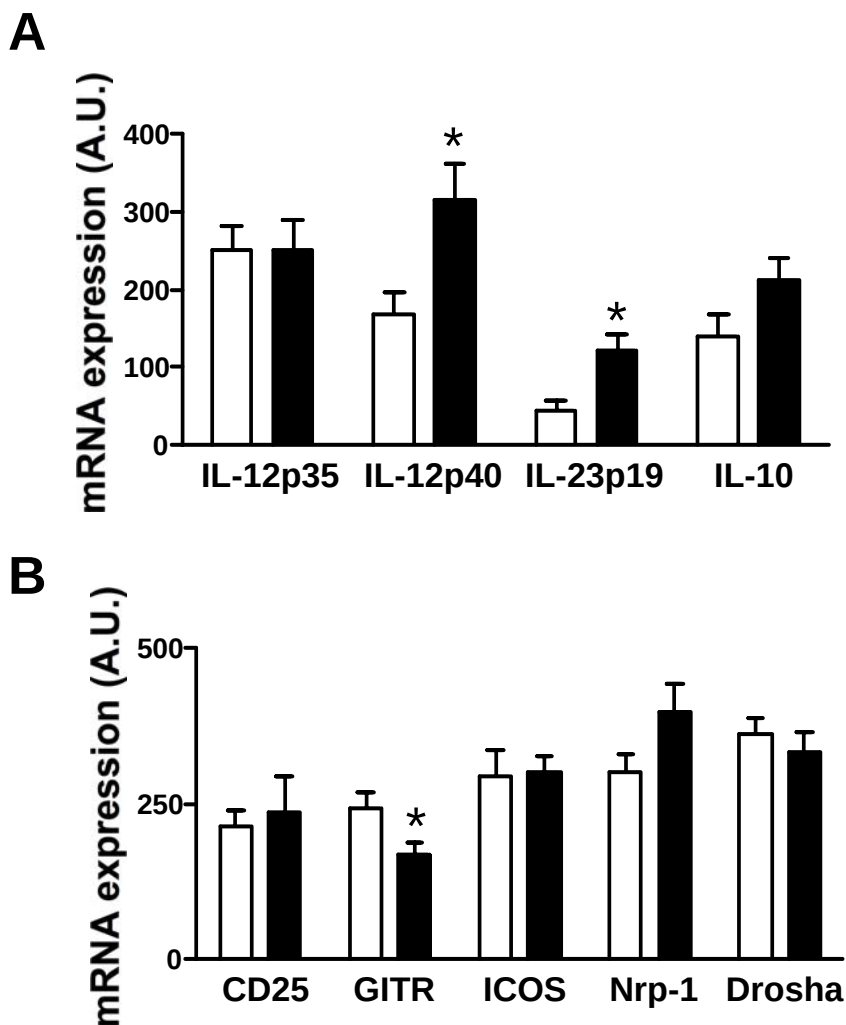
D



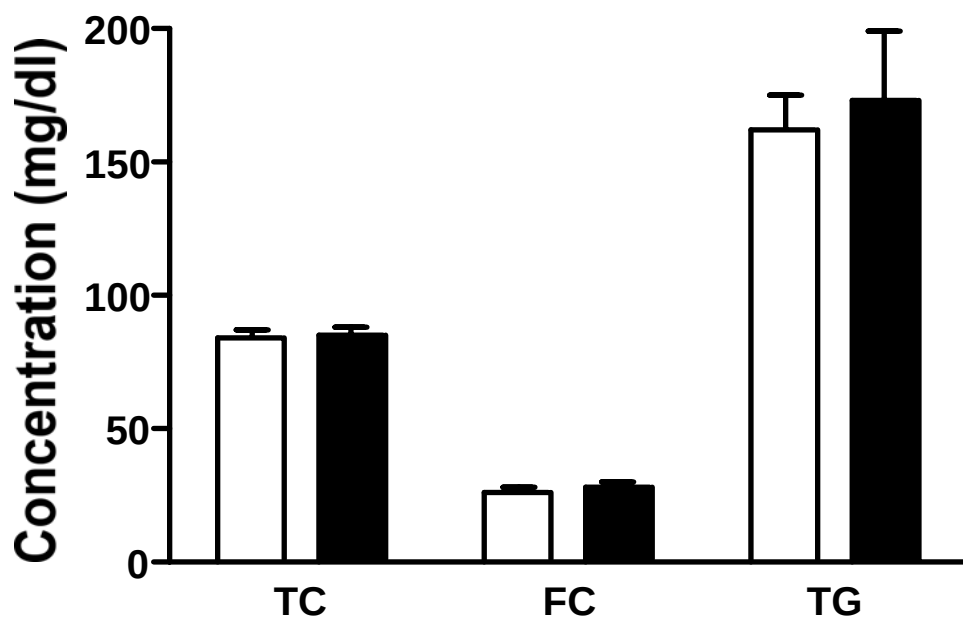
Supplementary Figure III. Intracellular staining of hBcl-2 in bone marrow derived dendritic cells from *wt* and *DC-hBcl-2* mice (A). The shaded profile represents *wt* mice and the open profile *DC-hBcl-2* mice. BMDCs derived from *wt* and *DC-hBcl-2* mice were submitted to serum and growth factor deprivation for 24 and 48 hours and survival was determined by Annexin-V/PI staining (B). Controls are BMDCs derived from *wt* grown in complete medium containing serum and growth factors. *DC-hBcl-2* mice exhibited greater DC abundance (C) and enhanced T cell activation at steady state (D). Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.



Supplementary Figure IV. Assessment of chimerism in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice. The amount of *Ldl-r* ko DNA was determined in DNA from bone marrow cells of *wt*→*Ldl-r*^{-/-} and *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice. More than 95% of the *Ldl-r* alleles in *DC-hBcl-2*→*Ldl-r*^{-/-} mice were of donor origin.

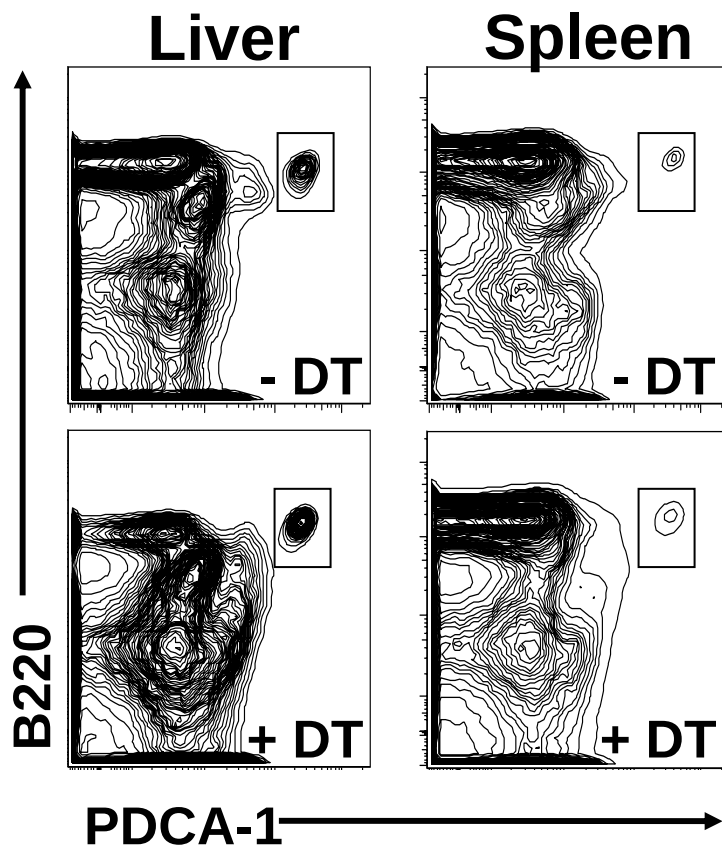


Supplementary Figure V. Levels of mRNA expression of functional markers for dendritic cells (A) and regulatory T cells (B) were evaluated by qPCR in spleens from *DC-hBcl-2 Apoe*^{-/-} (n=7) and *Apoe*^{-/-} (n= 10) mice fed a Western diet for 4 to 9 weeks. Statistically significant differences: * $P < 0.05$.

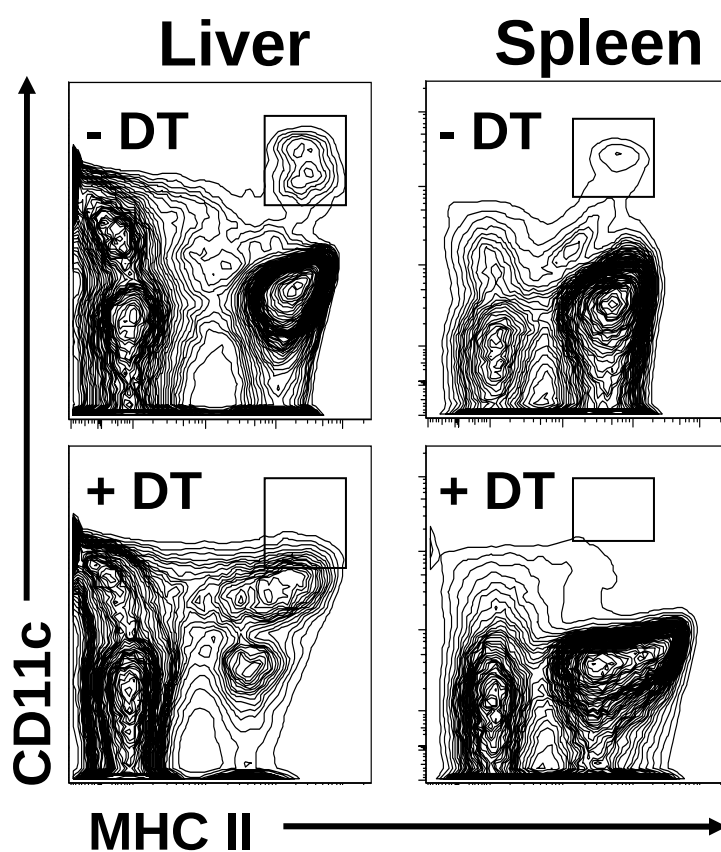


Supplementary Figure VI. Circulating levels of total cholesterol, free cholesterol and triglyceride in chow-fed, 6 week old, *DC-hBcl-2* mice as compared to littermate controls.

pDCs



cDCs



Supplementary Figure VII. Dendritic cells populations (cDCs and pDCs) in the liver and spleen of *CD11c-DTR* mice 24 hours after i.v. injection of DT or vehicle. Flow cytometric analysis revealed that pDCs are resistant to DT-induced depletion while cDCs are depleted in both spleen and liver.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol*. 2002;169:3006-3014.
2. Chen M, Wang YH, Wang Y, Huang L, Sandoval H, Liu YJ, Wang J. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science*. 2006;311:1160-1164.
3. Gautier EL, Huby T, Ouzilleau B, Doucet C, Saint-Charles F, Gremy G, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1625-1631.
4. Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002;17:211-220.
5. Huby T, Doucet C, Dachet C, Ouzilleau B, Ueda Y, Afzal V, Rubin E, Chapman MJ, Lesnik P. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J Clin Invest*. 2006;116:2767-2776.
6. Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX3CR1-/- mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*. 2003;111:333-340.
7. Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2004;114:427-437.
8. Binder CJ, Horkko S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, Shaw PX, Palinski W, Witztum JL, Silverman GJ. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nat Med*. 2003;9:736-743.
9. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol*. 2008;180:6941-6946.

3. Annexe 3 Article: Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice.

**Arteriosclerosis, Thrombosis,
and Vascular Biology**

ATVB/2011/239111

Supplemental Files? N

Article Type: Original Contribution

Downloaded on: September 22, 2011

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice.

Andrew I. U. Shearn^{1,2}, Virginie Deswaerte^{1,2,5}, Emmanuel L. Gautier¹, Flora Saint-Charles^{1,2}, John Pirault^{1,2}, Edmund B. Rucker III⁴, Sophie Beliard^{1,2,3}, John Chapman^{1,2}, Wendy. Jessup⁵, Thierry Huby^{1,2,3} and Philippe Lesnik^{1,2,3}.

¹ INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, F-75013, Paris, France

² UPMC Univ Paris 06, UMR-S 939, F-75013, Paris, France

³ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Endocrinologie-Métabolisme, Paris, France

⁴ Animal Sciences Unit, University of Missouri, Columbia, USA;

⁵ Macrophage Biology Group, Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Sydney, Australia.

Running title: Impact of macrophage apoptosis on atherosclerosis and plasma cholesterol levels

KEY WORDS

Atherosclerosis - macrophage - dendritic cells - survival - inflammation - cholesterol - apoptosis - cell death.

Word count: body (4752) abstract (216)

Number of figures: 4

Number of Tables: 1

Address correspondence to:

Dr Philippe Lesnik, INSERM UMR-S 939, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, 83 Boulevard de l'hôpital, F-75013, Paris, France

Tel: (33)-1-42177860; Fax: (33)-1-45828198; e-mail: philippe.lesnik@upmc.fr

Abstract

Background: Bcl-x is the most abundantly expressed member of the Bcl-2 gene family in macrophages but its role in macrophage apoptosis during atherogenesis is unknown.

Methods and results: We previously reported the dual role of macrophage survival in the development of atherosclerosis, perhaps reflecting growing impairment of efferocytosis during plaque progression. We specifically inactivated Bcl-x in macrophages and evaluated its impact on atherosclerotic lesion formation in Apoe^{-/-} mice at early and advanced stages of the disease. Bcl-x deficiency in macrophages increased susceptibility to apoptosis, resulting in the depletion of tissue macrophages *in vivo*, including its major pool, Küppfer cells. We also observed enhanced cholesterolemia that was however not associated with any acceleration of early atherosclerotic plaque progression, suggesting that the atheroprotective effect of macrophage apoptosis at that stage of disease was overwhelmed by enhanced cholesterol levels. Bcl-x^{KOmac}/Apoe^{-/-} mice exhibited significantly larger advanced lesions than control mice. These lesions showed vulnerable traits. Such enhanced lesion size may occur as a result not only of apoptotic cell accumulation but also of elevated cholesterol levels.

Conclusions: Modulation of macrophage resistance to apoptosis through targeted deletion of Bcl-x has a major impact on the entire macrophage cell population in the body, including Küppfer cells. Macrophage survival may, therefore, not only influence atherosclerotic plaque development and vulnerability but also cholesterol metabolism.

Introduction.

Chronic inflammation of the arterial wall is a fundamental feature of atherosclerosis and is characterized by the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) and immune cells driving both innate and adaptive immunity¹. Monocytes that have been attracted to the inflamed vessel differentiate into macrophages, the major cell type found within atherosclerotic lesions. These macrophages then gorge themselves on cholesterol derived from modified LDL, which they esterify to neutralise the potentially cytotoxic and pro-apoptotic effects of free cholesterol². However, the accumulation of pro-inflammatory, pro-oxidizing and pro-apoptotic stimuli favors macrophage death, the formation of apoptotic debris and supports necrotic core growth³. This, in turn, may promote plaque disruption and severe thrombotic events in humans^{4, 5}. In support of this hypothesis, experimental evidence shows that vulnerable, necrotic plaques display increased macrophage apoptosis^{6, 7}. Given the potential consequences of macrophage apoptosis in advanced atherosclerotic lesions, determining the molecular mechanisms of macrophage death in advanced lesions is therefore a critical goal.

Macrophage death occurs at all stages of disease development⁸. However, it has been suggested that macrophage apoptosis may have a different impact on plaque progression depending on the stage of lesion development during which it occurs^{9, 10}. Accordingly, in vivo studies have shown that disruption of the gene coding for the pro-apoptotic molecule Bax resulted in an increase in early atherosclerotic lesions¹¹. It was also shown that disruption of the anti-apoptotic factor AIM attenuated early plaque formation¹². Our previous studies in which macrophage resistance to apoptosis was enhanced using macrophage-specific human Bcl-2 overexpression, have also shown accelerated early plaque development¹³. However, enhanced macrophage survival delayed advanced plaque progression, while chronic induction of apoptosis in established lesions resulted in the accumulation of apoptotic cells in advanced lesions and enhanced plaque progression¹³.

The relative level of expression of pro-apoptotic (e.g. Bax and Bak) and anti-apoptotic (e.g. Bcl-2 and Bcl-x) proteins of the Bcl-2 family determines the overall sensitivity of a cell to apoptotic stimuli¹⁴. In macrophages from atherosclerotic lesions there is essentially a complete lack of Bcl-2 and little Bcl-x¹⁵⁻¹⁷. There are also increased levels of the pro-apoptotic proteins Bad and Bax¹⁵⁻¹⁷. Cell culture studies have shown that Bcl-2 and Bcl-x may

be involved in the protection of macrophages against apoptosis¹⁸⁻²¹. However, one study evaluated the in vivo implication of Bcl-2 in the survival of macrophages and its consequences in atherosclerosis²². In this study, deletion of the floxed Bcl-2 gene was mediated by Cre recombinase under the control of the Lysozyme M gene, resulting in the deletion of Bcl-2 in differentiated macrophages, including those present in atherosclerotic lesions²². As Bcl-x may represent an alternative pathway to control macrophage survival, we chose to specifically investigate the impact of Bcl-x deficiency on plaque progression. We evaluated the impact of Bcl-x deletion both at early and advanced stages of the disease as apoptosis exerts different effects on atherogenesis as a function of lesion stage^{9, 13}. We addressed the question of the impact of macrophage Bcl-x on atherosclerotic lesion formation by crossing conditional Apoe^{-/-}/Bcl-x-floxed mice with Apoe^{-/-}/LysM^{Cre} mice. Using this model, we provide evidence that Bcl-x expression by macrophages plays an important protective role against apoptosis as its disruption resulted in reduction in these cells in tissues, in elevation in plasma cholesterol levels and in larger and more complicated advanced atherosclerotic lesions.

Materials and Methods.

Generation of Bcl-x^{flox/flox}-LysM^{Cre} Mice.

The floxed Bcl-x mice of mixed genetic background 129SvEv/C57BL6 were obtained from Dr. Edmund B. Rucker (University of Missouri, Columbia)²³. LysM-Cre mice in which Cre recombinase expression is driven by the lysozyme M promoter via gene targeting into the endogenous lysozyme M locus²⁴ were obtained from the Jackson Laboratory (Stock Number: 004781; backcrossed 6 times in C57BL6 genetic background). Multiple crosses of Bcl-x^{flox/flox} mice, with LysM^{cre/cre} mice and Apoe^{-/-} mice resulted in an almost pure C57BL/6 genetic background. Mice homozygous for Apoe^{-/-} and heterozygous for both Bcl-x^{flox/+} and LysM^{Cre/+}, were then bred with homozygous Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-} mice to generate the mice used for this study. For the studies described herein, Bcl-x^{flox/flox}/LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} were used as macrophage Bcl-x deficient mice while Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-}, LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} were used as control mice.

Atherosclerosis studies

To assess the impact of macrophage Bcl-x on atherosclerosis progression, 7 weeks old Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-}, Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-}, LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice were fed a 1%-

cholesterol rich diet (Harlan Teklad, TD97131) for 10 weeks, or a Western diet consisting of 0.15% cholesterol and 20% saturated fat (SAFE, France) for 10 or 27 weeks.

Plasma lipid analyses, quantification of atherosclerotic lesions, TUNEL staining, immunohistochemistry, analysis of gene expression by Q-PCR, Isolation of liver leukocytes and of peritoneal macrophages, flow cytometry. and generation of bone marrow-derived macrophages (BMDM). All these procedures were performed as previously described^{13, 25-27} and are detailed in the Supplemental Methods Section.

Statistical analysis.

Statistical calculations were performed using GraphPad Prism, version 4.03. Results were analyzed by Student's unpaired *t*-tests with Welch's correction if variances were unequal. $p < 0.05$ was considered significant.

Results.

Generation and characterization of macrophage-specific Bcl-x deficiency.

Mice in which exons 1 and 2 of the Bcl-x gene were flanked with loxP sites were crossed with mice expressing Cre recombinase under the control of the lysozyme M gene to generate mice in which Bcl-x was deleted in macrophages^{22, 24, 28}. DNA recombination was confirmed in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages in which the wild-type allele was almost undetectable. When backcrossed into an Apoe^{-/-} background, Bcl-x^{KO Mac} mice exhibited no obvious developmental or morphological abnormalities. To confirm Bcl-x deletion, Bcl-x mRNA levels were measured in bone marrow derived macrophages (BMDM) from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and Apoe^{-/-} mice by RT-PCR. mRNA expression of Bcl-x in BMDM of Bcl-x^{KO Mac} mice was 0.002% of that of controls ($P < 0.000001$) while expression of Bcl-2 was increased two-fold in Bcl-x^{KO Mac} macrophages ($P < 0.01$) (Fig. 1A). The mRNA levels of the proapoptotic genes Bad, Bax and Bid were similar in BMDM from Bcl-x^{KO Mac} mice and controls (Fig. 1A). Despite up-regulation of Bcl-2, BMDM derived from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were markedly more susceptible to free cholesterol-induced apoptosis when incubated

with Ac-LDL and an ACAT inhibitor ($P < 0.01$, fig. 1B), arguing for a pivotal role of Bcl-x in free-cholesterol induce apoptosis. Similarly, freshly harvested peritoneal macrophages, and cultured peritoneal and pulmonary macrophages from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice were more susceptible to apoptosis induced by serum starvation as compared to Apoe^{-/-} mice (Supplemental fig.1A). In addition, we assessed leukocyte and monocyte subset counts on the different groups of mice maintained under both chow diet and cholesterol-rich diet. In female mice fed a chow diet, we found that such cell counts were not altered in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as compared to wild type Apoe^{-/-} mice (Fig. 1C-D). By contrast, under the cholesterol-rich diet, we observed that the leukocyte count was 30% higher in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice than in Apoe^{-/-} mice (Fig. 1C). As observed in other studies, the cholesterol-rich diet induced monocytosis (30% higher in controls) which was more severe in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice (150% higher) and was linked to increase in the Gr1^{high} monocyte subset (Fig. 1D). The possibilities of gender differences related to the effect of Bcl-x deficiency were excluded; indeed, a similar leukocyte and monocyte pattern was observed in males (Supplemental fig. 1B-C).

Impact of macrophage-specific Bcl-x deletion on atherogenesis and cholesterol levels.

Based on our previous observations showing that increased survival of macrophages results in larger early lesions but smaller advanced lesions, we decided to use a complimentary strategy and assessed the impact of macrophages more susceptible to stress-induced death on lesion progression. For this purpose, Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and controls were fed cholesterol-enriched diets for 10 (0.15% and 1% cholesterol) or 27 (0.15% cholesterol) weeks. Unexpectedly, we observed higher plasma cholesterol levels in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice compared to Apoe^{-/-} controls at all time points and under all diets, including the basal conditions (chow diet fed mice) (Table 1 and supplemental table 1). However, after 10 weeks of diet, aortic root lesion area was similar in both Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice and controls fed a 0.15% (Fig. 2A) or a 1% cholesterol-enriched diet (Fig. 2B). As expected, early lesion area was larger in mice fed a 1% cholesterol-enriched diet compared to those fed a 0.15% cholesterol-enriched diet (Fig. 2A-B); 128 000 μm^2 versus 292 000 μm^2 in control females ($P < 0.004$). As previously reported^{8, 13, 29}, no TUNEL⁺ cells were present in these early lesions (data not shown). This suggests an efficient removal of apoptotic cells at this stage of the disease. Seventeen additional weeks on a 0.15% cholesterol-enriched diet resulted in larger (>10-fold) and more complicated lesions with necrotic core formation. At this time point, en

face analysis of the descending aorta showed that lesion areas were 51% larger ($P<0.006$) in females and 25% larger ($P<0.04$) in males in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice relative to controls (Fig. 3A). In contrast to the 10 week time point, the mean area of the aortic root lesion in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice was 27% larger compared to controls after 27 weeks of diet ($P<0.02$, Fig. 3C).

We next quantified TUNEL-positive cells in advanced lesions (27 weeks). At 27 weeks of diet, we observed a 3-fold increase in the number of apoptotic cells per lesion in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls ($P<0.006$, Fig. 3E), corresponding to a 3-fold increase in apoptotic cell content per mm^2 of lesion ($P<0.04$, Fig. 3F). As macrophages undergoing apoptosis in advanced plaques might likely contribute to necrotic core formation, an indice of plaque instability, we measured acellular areas in our animals and observed that the necrotic area was 60% larger in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice compared to controls ($P<0.0001$, fig. 3G). Collagen content, also indicative of plaque stability, was decreased by 35% in the aortic sinus of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ compared to $Apoe^{-/-}$ control mice ($P<0.02$, Fig. 3H). In males, changes in plaque size (Fig. 2B, Fig. 3A) and in plasma cholesterol (Supplemental Table 1) were comparable to that observed in females (Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 3A, Fig 3C, Table 1) suggesting that the impact of Bcl-x deficiency was not gender specific as previously reported for macrophage Bcl-2 deficiency in $Bcl-2^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice²². No significant differences in body weight were observed between genotypes at any time point for both males and females (Table 1 and Supplemental Table 1).

Impact of macrophage-specific Bcl-x deletion on gene expression and leukocytes in the liver.

To further document mechanisms by which Bcl-x deficiency in macrophages might affect plasma cholesterol levels, we extracted mRNA from liver of mice fed a 0.15% cholesterol (Fig. 4) or a 1% cholesterol-enriched diet for 10 weeks to perform quantitative RT-PCR. Levels of mRNA for Bcl-x were decreased in the liver of $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$ mice as compared to controls but significant changes were only observed in mice fed the 0.15% cholesterol-enriched diet (Fig 4A; supplemental Fig. 2A). As expected, levels of mRNA for Lysozyme M were significantly decreased (-39%) in $LysM^{cre/wt}/Apoe^{-/-}$ mice as compared to control mice that did not express the Cre recombinase ($Bcl-x^{flx/flx}/Apoe^{-/-}$ and $Bcl-x^{wt/wt}/Apoe^{-/-}$ mice) reflecting a decrease in Lysosome M expression due to its heterozygous form in $LysM$ -Cre positive cells. An additional decrease was observed in $Bcl-x^{KO\ Mac}/Apoe^{-/-}$

mice reflecting both the former mechanism and an additional depletion of macrophages expressing Lysosome M (-78%, $p < 0.0001$, Fig. 4A). A similar pattern of expression was observed in mice maintained on 1% cholesterol-enriched diet (Supplemental Fig. 2A). mRNAs coding for the mononuclear cell markers CD68 and F4/80 were significantly decreased (-32% and -24%, respectively) in the liver of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice compared to controls (Fig. 4A, Supplemental Fig. 2A). We also evaluated the expression of several genes implicated in lipid homeostasis in the liver. As shown in Figure 4C, the expression levels of LDL-R, ABCG1 and SR-A were significantly decreased (-29%, -40% and -29% respectively) while those of ACAT-2, LXR α , ABCA1, and SR-BI were similar in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} and control mice. A similar pattern of expression was observed in mice maintained on 1% cholesterol-enriched diet (Supplemental Fig. 2B). We were also able to demonstrate an ongoing inflammatory process in the liver of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as there was significant upregulation of MCP-1 mRNA in comparison to controls, indicative of the activation of endothelial cells and macrophages (Figure 4D). Flow cytometric analysis revealed that the Küppfer cell population (resident macrophage population of the liver) was significantly reduced (-27%, $P < 0.01$) in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice compared to controls, while the DC population was unaffected (Fig. 4E). Interestingly, a 2.2 fold increase in MHC Class II positive liver leukocytes was observed in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as compared with controls (Fig. 4E; $P < 0.0003$).

Discussion.

Given the crucial role of macrophages the maintenance of homeostasis and the regulation of innate immune responses, the regulation of their life span is critical in both physiological and pathological processes. Macrophage survival depends on multiple pro- and anti-apoptotic molecules, among which the anti-apoptotic protein Bcl-x is hypothesized to be critically involved both in monocyte/macrophage differentiation and survival, both in humans and mice¹⁸⁻²¹. Our experimental model, in which macrophages specifically lack Bcl-x, further emphasize the critical involvement of Bcl-x in the protection of macrophages from apoptosis. Indeed, we demonstrated that expression of Bcl-x is almost abolished in BMDM from Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice resulting in poor resistance to apoptotic stress in vitro. In vivo, we noticed a clear depletion of kupffer cells, the liver resident macrophages, as shown by the reduction in expression of mRNA encoding genes mainly associated with macrophages (LysM, SR-A, ABCG1, CD68, and F4/80) in the liver of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice when

compared to controls. Of note, the reduction of Bcl-x expression was compensated by changes in the expression of the anti-apoptotic gene Bcl-2 as observed in BMDM, but not to an extent that afford protection against apoptosis.

Our data clearly show a significant effect of Bcl-x deficiency in macrophages on circulating cholesterol levels of mice maintained on chow-, and cholesterol-enriched diets. Interestingly, these observations are consistent with earlier observations in both mice and humans, which also suggest a role for mononuclear phagocytes in cholesterol homeostasis. For example, the hematopoietic growth factor macrophage colony-stimulating factor (M-CSF or CSF-1) was reported to lower cholesterol levels in rabbits and non-human primate models^{30, 31}. At the opposite, op/op mice harbouring a mutation in the csf1 gene, which results in a reduction in monocyte and several tissue macrophage populations such as Küpffer cells³², present a marked hypercholesterolemia when backcrossed in an apoE-deficient background (reference)³³. We also previously observed a similar phenotype in CD11c-DTR ApoE^{-/-} mice in which a transient elimination of DCs increased plasma cholesterol levels²⁷. Taken together, these observations indicate that mononuclear phagocytes may directly or indirectly influence cholesterol homeostasis. The mechanisms responsible for the increase in total plasma cholesterol levels in Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-} mice were not explored in the framework of this study, and the deficiency in ABCG1 mRNA in the liver may likely not contribute to the elevation of circulating cholesterol levels as ABCG1 deficiency in bone marrow derived macrophages was not shown to be associated with enhanced cholesterol levels^{34, 35}. The lower expression of ABCG1 mRNA may likely reflect the depletion of Küpffer cells as it is primarily expressed by these cells in the liver³⁶.

As macrophage apoptosis has been shown to limit the development of early atherosclerotic lesions^{11-13, 37, 38}, we would have expected a protective effect in early lesions in Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-} mice. However, due to concomitant elevation in plasma cholesterol in Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-} mice, the protective effect of increased macrophage death may have been overwhelmed by the hypercholesterolemia observed in these mice. The absence of TUNEL positive cells in the lesions of Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-} and control mice may reflect efficient efferocytosis at this stage^{39, 40}. Thus, Bcl-x might still play an important role in the control of macrophage survival in early lesions.

In advanced lesions, Bcl-x deficiency in macrophages was associated with larger lesion size in Bcl-x^{KO} Mac/ApoE^{-/-} mice as compared to ApoE^{-/-} lesions. This finding was associated with a

higher frequency of apoptotic cells, a larger necrotic core area and a lower collagen content in the lesions of Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice. Interestingly, all these features are indicative of enhanced plaque vulnerability and further support the concept that apoptosis of macrophages favours necrotic core growth. In this model, we cannot distinguish the respective contribution of higher cholesterol levels or of higher susceptibility of macrophages to apoptosis in lesion development in Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice during the period of advanced plaque growth. However, irrespective of the role of higher cholesterol levels, this might not always be correlated to plaque growth⁴¹. The depletion of macrophages seems to occur in the latter stages of the disease as we observed lower macrophage content in livers and spleens of 1 year old Bcl-x^{KO Mac}/Apoe^{-/-} mice as compared to controls (data not shown). These results are consistent with our previous observations indicating that macrophage apoptosis in advanced lesions is pro-atherogenic¹³.

In summary, the present study confirms that macrophage apoptosis appears to be more important in advanced rather than early lesions development, thereby providing a rationale for the association between apoptotic cell accumulation, necrotic core formation and resulting vulnerable traits. In the quest to identify specific molecular targets and processes that would target the growth of vulnerable lesions, our data suggest that sustaining Bcl-x levels in macrophages would be beneficial both in reducing apoptotic macrophage accumulation in advanced atherosclerotic plaques and maintaining cholesterol homeostasis in the liver, supporting the concept of cross-talk between innate immunity and metabolism.

Acknowledgments.

A.S. was supported by a Fellowship from GlaxoSmithKline. This work was supported by an Award to P.L. from The Fondation de France. T.H. and P.L. gratefully acknowledge the award of a "Contrat d'Interface" by the Assistance Publique - Hôpitaux de Paris/INSERM.

Disclosures.

None.

References.

1. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*;12:204-212.
2. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516.
3. Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*. 1996;149:367-380.
4. Virmani R, Burke AP, Kolodgie F. Morphological characteristics of coronary atherosclerosis in diabetes mellitus. *Can J Cardiol*. 2006;22 Suppl B:81B-84B.
5. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol*. 2000;157:1259-1268.
6. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:330-335.
7. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1370-1380.
8. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005;111:1814-1821.
9. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2255-2264.
10. Stoneman V, Braganza D, Figg N, Mercer J, Lang R, Goddard M, Bennett M. Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circ Res*. 2007;100:884-893.
11. Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:174-179.
12. Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Miyazaki T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell Metab*. 2005;1:201-213.
13. Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*. 2009;119:1795-1804.
14. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:647-656.
15. Kockx MM, De Meyer GR, Buysens N, Knaapen MW, Bult H, Herman AG. Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res*. 1998;83:378-387.
16. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1998;97:2307-2315.
17. Saxena A, McMeekin JD, Thomson DJ. Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *J Pathol*. 2002;196:335-342.

18. Lin H, Chen C, Chen BD. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary cultures of bone marrow cells. *Biochem J.* 2001;353:299-306.
19. Zhang J, Li Y, Yu M, Chen B, Shen B. Lineage-dependent NF-kappaB activation contributes to the resistance of human macrophages to apoptosis. *Hematol J.* 2003;4:277-284.
20. Sevilla L, Zaldumbide A, Carlotti F, Dayem MA, Pognonec P, Boulukos KE. Bcl-XL expression correlates with primary macrophage differentiation, activation of functional competence, and survival and results from synergistic transcriptional activation by Ets2 and PU.1. *J Biol Chem.* 2001;276:17800-17807.
21. Busca A, Saxena M, Kryworuchko M, Kumar A. Anti-apoptotic genes in the survival of monocytic cells during infection. *Curr Genomics.* 2009;10:306-317.
22. Thorp E, Li Y, Bao L, Yao PM, Kuriakose G, Rong J, Fisher EA, Tabas I. Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} mice lacking macrophage Bcl-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29:169-172.
23. Wagner KU, Claudio E, Rucker EB, 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, Siebenlist U, Hennighausen L. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development.* 2000;127:4949-4958.
24. Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 1999;8:265-277.
25. Gautier EL, Huby T, Ouzilleau B, Doucet C, Saint-Charles F, Gremy G, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1625-1631.
26. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Chapman MJ, Lesnik P. Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock. *J Immunol.* 2008;180:6941-6946.
27. Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, Miller ER, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation.* 2009;119:2367-2375.
28. Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA. Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000371.
29. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation.* 2003;108:3134-3139.
30. Shimano H, Yamada N, Motoyoshi K, Matsumoto A, Ishibashi S, Mori N, Takaku F. Plasma cholesterol-lowering activity of monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). *Ann N Y Acad Sci.* 1990;587:362-370.
31. Stoudemire JB, Garnick MB. Effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor on plasma cholesterol levels. *Blood.* 1991;77:750-755.
32. Witmer-Pack MD, Hughes DA, Schuler G, Lawson L, McWilliam A, Inaba K, Steinman RM, Gordon S. Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *J Cell Sci.* 1993;104 (Pt 4):1021-1029.

33. Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, Wang XP, Imes S, Fishbein MC, Clinton SK, Libby P, Lusis AJ, Rajavashisth TB. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 1997;150:1687-1699.
34. Out R, Jessup W, Le Goff W, Hoekstra M, Gelissen IC, Zhao Y, Kritharides L, Chimini G, Kuiper J, Chapman MJ, Huby T, Van Berkel TJ, Van Eck M. Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ Res.* 2008;102:113-120.
35. Westerterp M, Koetsveld J, Yu S, Han S, Li R, Goldberg IJ, Welch CL, Tall AR. Increased atherosclerosis in mice with vascular ATP-binding cassette transporter G1 deficiency--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:2103-2105.
36. Ye D, Hoekstra M, Out R, Meurs I, Kruijt JK, Hildebrand RB, Van Berkel TJ, Van Eck M. Hepatic cell-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter profiling identifies putative novel candidates for lipid homeostasis in mice. *Atherosclerosis.* 2008;196:650-658.
37. Merched AJ, Williams E, Chan L. Macrophage-specific p53 expression plays a crucial role in atherosclerosis development and plaque remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1608-1614.
38. van Vlijmen BJ, Gerritsen G, Franken AL, Boesten LS, Kockx MM, Gijbels MJ, Vierboom MP, van Eck M, van De Water B, van Berkel TJ, Havekes LM. Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Circ Res.* 2001;88:780-786.
39. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007;73:470-480.
40. Tabas I. Apoptosis and efferocytosis in mouse models of atherosclerosis. *Curr Drug Targets.* 2007;8:1288-1296.
41. 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;92:8264-8268.

Table 1. Body weight and lipid parameters.

<i>Females on Apoe^{-/-} background</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Bcl-x^{KO} Mac</i>	<i>P</i>
<i>7 week old females on chow diet</i>	n=37	n=31	
Weight, g	16.5 ± 0.4	17.4 ± 0.5	NS
Total cholesterol, mg/dl	400 ± 16	523 ± 24	<0.00004
Free cholesterol, mg/dl	135 ± 6	172 ± 7	<0.0002
Triglycerides, mg/dl	158 ± 16	161 ± 15	NS
<i>17 week-old females maintained for 10 weeks on a 1% cholesterol rich diet</i>	n=23	n=20	
Weight at sacrifice, g	18.2 ± 0.4	19.29 ± 0.6	NS
Total cholesterol, mg/dl	1129 ± 83	1701 ± 71	<0.00001
Free cholesterol, mg/dl	355 ± 29	493 ± 34	<0.003
Triglycerides, mg/dl	80 ± 5	92 ± 7	NS
<i>34 week-old females maintained 27 weeks on a 0.15% cholesterol rich diet</i>	n=9	n=8	
Weight at sacrifice, g	24.4 ± 0.9	21.8 ± 1.2	NS
Total cholesterol, mg/dl	717 ± 56	1060 ± 84	<0.002
Free cholesterol, mg/dl	242 ± 19	328 ± 24	<0.01
Triglycerides, mg/dl	52 ± 8	86 ± 14	NS

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Characterization of mononuclear cells in Bcl-x null Apoe^{-/-} mice. Levels of anti-apoptotic genes measured in bone marrow-derived macrophages (BMDM) from Bcl-x^{KO} Mac/APoe^{-/-} mice and Apoe^{-/-} mice by RT-PCR (A). Peritoneal macrophages from control (Bcl-x^{flox/flox}/Apoe^{-/-} and LysM^{Cre/+}/Apoe^{-/-}) and Bcl-x^{KO} Mac/APoe^{-/-} mice were incubated under FC-loading conditions and analyzed for apoptosis by TUNEL staining. The percentage of apoptotic cells stimulated by treatment with Ac-LDL (50µg/ml) and an ACAT inhibitor (10µg/ml; S58035 Sandoz) is the ratio of TUNEL positive cells relative to DAPI positive cells (B). Quantitative analysis of circulating leukocytes (C) and monocyte subsets (D) in female mice maintained on chow diet or 1% cholesterol-enriched diet for 10 weeks. Values represent mean ± SEM of 15-20 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01, *** *P*<0.00001.

Figure 2. Quantification of early atherosclerotic lesions in aortic roots of mice. Mice were maintained on 0.15% (A) or 1% cholesterol-rich diet (B) for 10 weeks. Values represent the mean ± SEM of 10 mice per group.

Figure 3. Images and quantification of lesion surface, necrotic area, apoptotic cells and collagen content of advanced atherosclerotic lesions in mice fed a Western diet for 27 weeks. Quantification of lesions in aortic arch and thoracic aorta (A, B) and aortic roots (C, D) of Bcl-x^{KO} Mac/APoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice. Females are shown in figures B to I. The ratio of TUNEL positive cells per aortic root section (E), per Oil red O-positive staining areas were calculated for each mouse (F). Plaque necrosis was quantified by measuring the DAPI-negative acellular areas in the intima (G). Collagen content was assessed by Sirius Red staining (H, I). Photographs illustrate representative staining (D and I). Values represent the mean ± SEM of 8 mice per group. Statistically significant differences: * *P*<0.05, ** *P*<0.01 and *** *P*<0.0001.

Figure 4. Quantification of hepatic mRNA and leukocyte content in female mice fed a 0.15% cholesterol atherogenic diet. Levels of mRNA expression of functional markers of the genetic ablation carried out (A), mononuclear phagocytes (B), cholesterol metabolism (C) and inflammatory markers (D) were evaluated by qPCR in the livers of Bcl-x^{KO} Mac/APoe^{-/-} and Apoe^{-/-} mice fed a Western diet for 10 weeks. Relative mRNA expression of each gene

was normalized to the average expression of three housekeeping genes (beta-glucuronidase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3). Flow cytometric analysis of isolated liver leukocytes (KC: kupffer cells; DC: dendritic cells) (E). Values represent the mean $\pm$ SEM of 10 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.0001$

Supplemental Table 1. Body weight and lipid parameters.

<i>Males on Apoe^{-/-} background</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Bcl-x^{KO} Mac</i>	<i>P</i>
<i>7 week old males on chow diet</i>	n=16	n= 27	
Weight, g	19.8 ± 0.9	18.5 ± 0.5	NS
Total cholesterol, mg/dl	468 ± 21	595 ± 29	<0.002
Free cholesterol, mg/dl	165 ± 6	197 ± 35	<0.006
Triglycerides, mg/dl	316 ± 17	259 ± 23	NS
<i>17 week old males maintained for 10 weeks on a 1% cholesterol rich diet</i>	n=12	n=23	
Weight at sacrifice, g	20.9 ± 0.8	21.7 ± 0.4	NS
Total cholesterol, mg/dl	1195 ± 80	1706 ± 81	<0.0003
Free cholesterol, mg/dl	347 ± 23	457 ± 19	<0.001
Triglycerides, mg/dl	87 ± 8	88 ± 7	NS
<i>34 week old males maintained for 27 weeks on a 0.15% cholesterol rich diet</i>	n=8	n=12	
Weight at sacrifice, g	32.5 ± 1.1	29.9 ± 1.0	NS
Total cholesterol, mg/dl	873 ± 62	1134 ± 75	<0.03
Free cholesterol, mg/dl	277 ± 21	351 ± 23	<0.04
Triglycerides, mg/dl	104 ± 22	107 ± 10	NS

Supplemental Table 2. Q-PCR Primers

Gene Accession Number	Sense Primer	Antisense Primer
Bcl-xL NT_039207.7	5'-CCCCACCACAACCTCTCTCTT-3'	5'-TCCCTACACACCCCTCTCTG-3'
LysM NT_039500	5'-AAAACCCCAAGAGCTGTGAAT-3'	5'-GAATGCCTTGGGGATCTCTC-3'
CD68 NT_096135	5'-TTGGGAACTACACGTGGGC-3'	5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'
F4/80 NT_039649	5'-AGTACGATGTGGGGCTTTTG-3'	5'-CCCCATCTGTACATCCCACT-3'
LDL-R NT_039472	5'-CACTCACTGGTGACCGAAA-3'	5'-CATTGACATCGATGCTGGAG-3'
ACAT-2 NT_039472	5'-GTATTTGCAACGGAGGAGGA-3'	5'-GCCCAAGGGAGTCACATTTA-3'
LXR α NM_00177730.1	5'-AATCGAGGTCATGCTTCTGG-3'	5'-TGGAGAACTCAAAGATGGGG-3'
ABCA1 NT_109315	5'-GGCTGTCCAATTTTGTCTGG-3'	5'-TAGAACGGGCAGGTTGGTAG-3'
ABCG1 NT_039649	5'-AGGTCTCAGCCTTCTAAAGTTCCTC-3'	5'-TCTCTCGAAGTGAATGAAATTTATCG-3'
SRA NT_039460	5'-CTGGACAAACTGGTCCACCT-3'	5'-GTCCCCGATCACCTTTAACA-3'
SRBI NT_039313	5'-GCTGCGCTCGGCGTTGTCAT-3'	5'-GGGACGGGGATCTCCTTCCA-3'
MCP-1 NT_096135	5'-CCCTGTCATGCTTCTGGG-3'	5'-GGATCATCTTGCTGGTGAATG-3'
Bcl-2 NT_078297	5'-AGAGCGTCAACAGGGAGATG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3'
IFN γ NT_039500	5'-GAGGAACTGGCAAAAGGATG-3'	5'-GTTGCTGATGGCCTGATTG-3'
IL-1 β NT_039207	5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'	5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'
Stat-3 NT_165773	5'-GGAAATAACGGTGAAGGTGCT-3'	5'-CATGTCAAACGTGAGCGACT-3'
HPRT NT_039702	5'-TGACACTGGTAAAACAATGC-3'	5'-AACACTTCGAGAGGTCCTTT-3'
β -gus NT_039314	5'-CTCATCTGGAATTTGCCGA-3'	5'-GGCGAGTGAAGATCCCCTTC-3'
RPS3 NT_039433	5'-ATCAGAGAGTTGACCGCAGTTG-3'	5'-AATGAACCGAAGCACACCATA-3'
Bid NT_039353.7	5'-TCACAGACCTGCTGGTGTTTC-3'	5'-GTCTGGCAATGTTGTGGATG-3'
Bad NT_039687	5'-AGGACTTATCAGCCGAAGCA-3'	5'-GCTCAAACCTCTGGGATCTGG-3'
Bax NT_039424.7	5'-TGGAGATGAACTGGACAGCA-3'	5'-GAAGTTGCCATCAGCAAACA-3'

Supplemental Figure 1. Susceptibility of macrophages to apoptosis and quantitative analysis of circulating leukocytes and monocyte subsets in male mice. Fresh peritoneal macrophages isolated from control $\text{Apoe}^{-/-}$ and $\text{Bcl-x}^{\text{KO Mac}}/\text{Apoe}^{-/-}$ mice were serum starved for 4 hours and analyzed for apoptosis by flow cytometry. Peritoneal and pulmonary macrophages isolated from control $\text{Apoe}^{-/-}$ and $\text{Bcl-x}^{\text{KO Mac}}/\text{Apoe}^{-/-}$ mice were cultured for 6 days, then serum-starved for 24 hours and analyzed for apoptosis by TUNEL staining (A). Quantitative analysis of total circulating leukocytes (B), monocytes and individual monocyte subsets (C) in the different groups of male mice maintained under both non-inflammatory (chow diet) and atherosclerotic conditions (cholesterol-rich diet). Values represent the mean $\pm$ SEM of a minimum of 15-20 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Supplemental Figure 2. Quantification of hepatic mRNA in female mice fed a 1% cholesterol-enriched diet. Levels of mRNA expression of functional markers of the genetic ablation (A), mononuclear phagocytes (A), cholesterol metabolism (B) were evaluated by qPCR in the livers of $\text{Bcl-x}^{\text{KO Mac}}/\text{Apoe}^{-/-}$ and $\text{Apoe}^{-/-}$ mice fed a cholesterol diet for 10 weeks. Relative expression of each gene was normalized to the average expression of mRNA for three housekeeping genes (beta-glucuronidase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase and ribosomal protein S3. Values represent the mean $\pm$ SEM of 10 mice per group. Statistically significant differences: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$.

Fig. 1

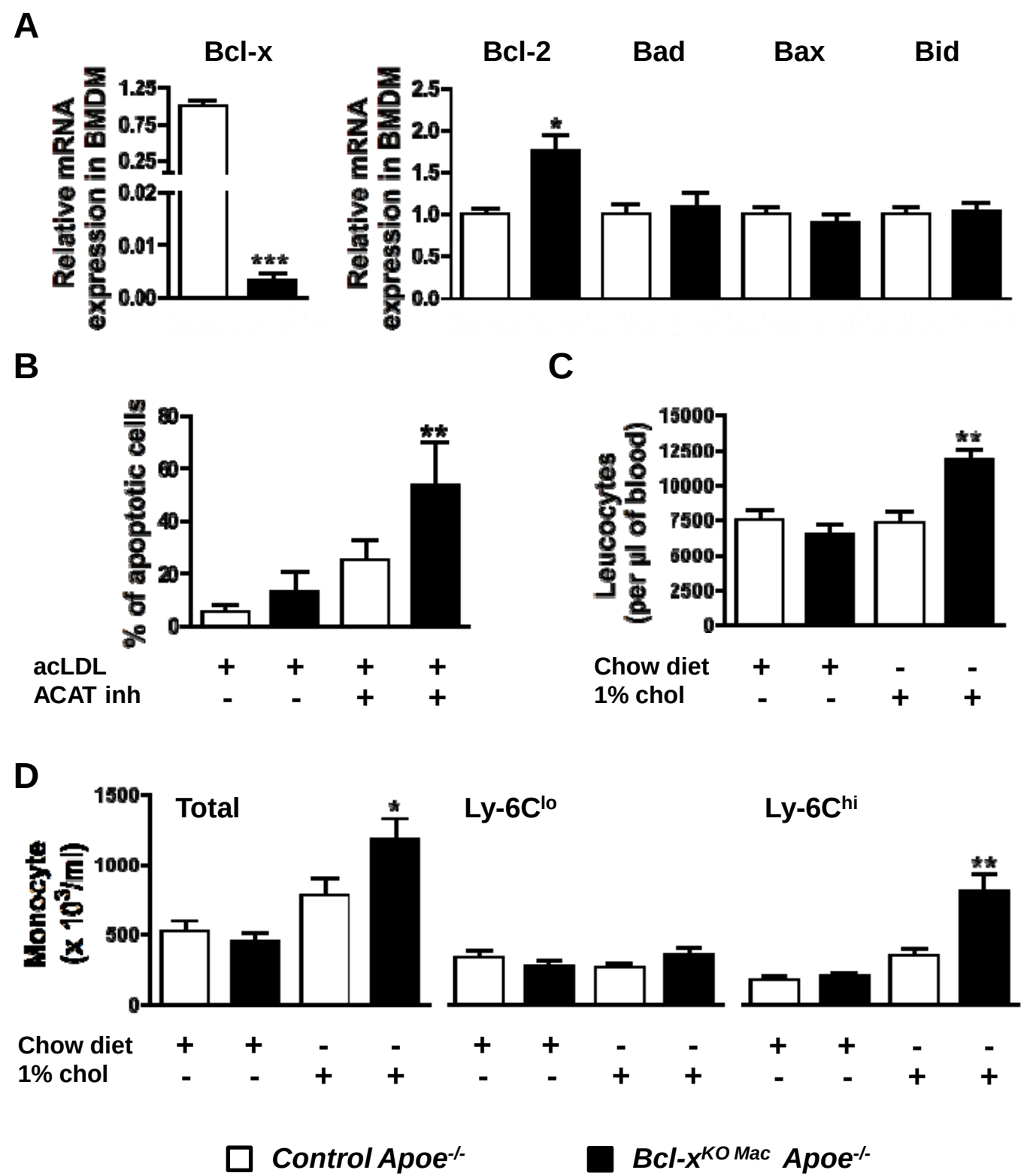


Fig. 2

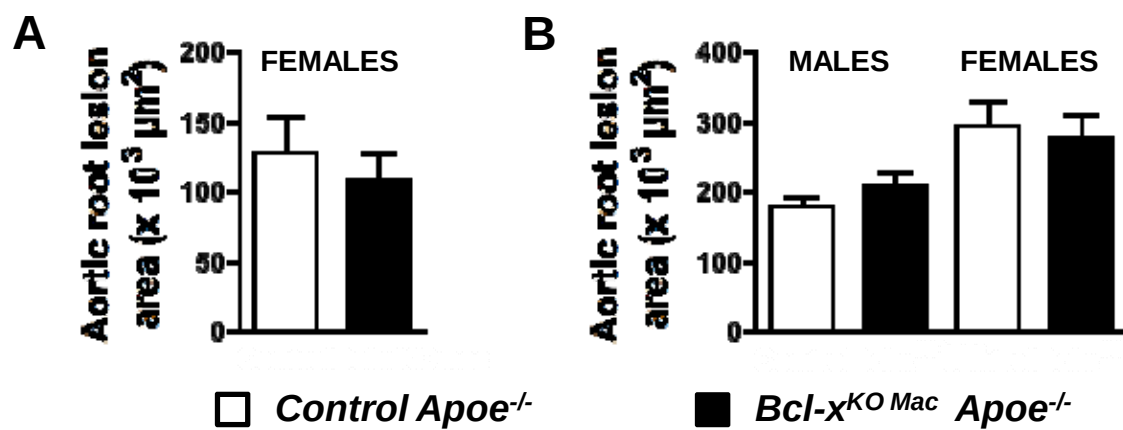


Fig. 3

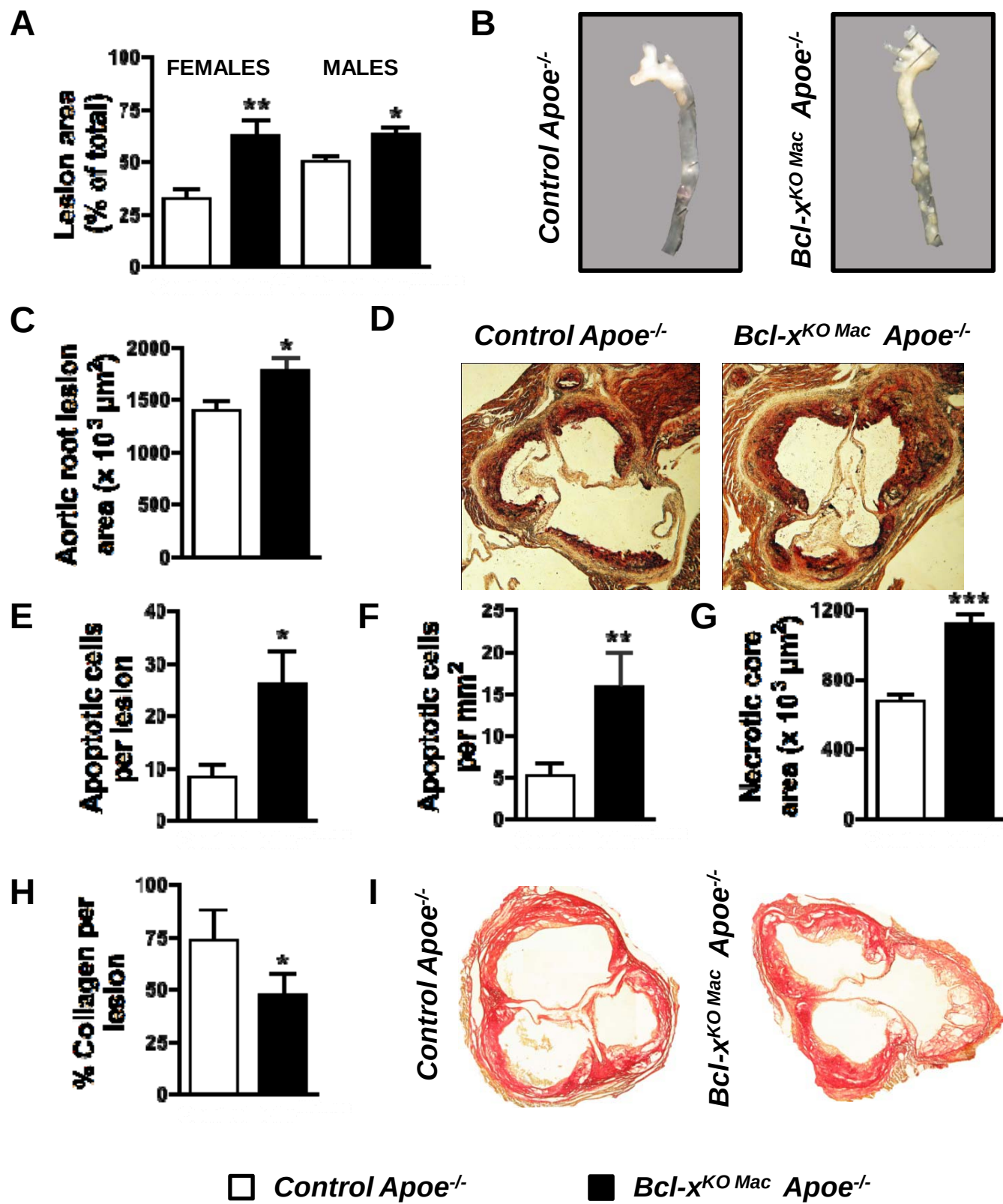
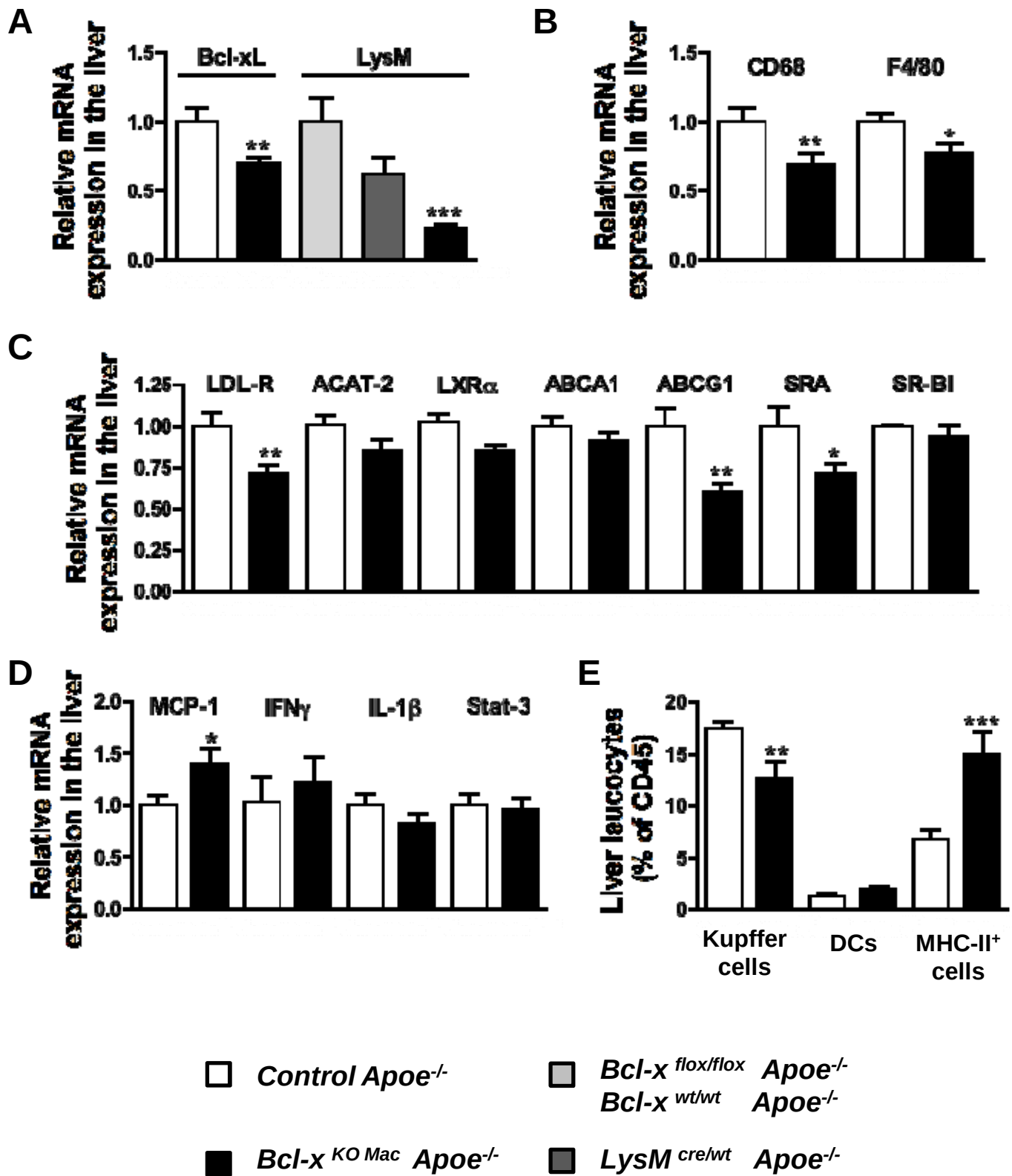
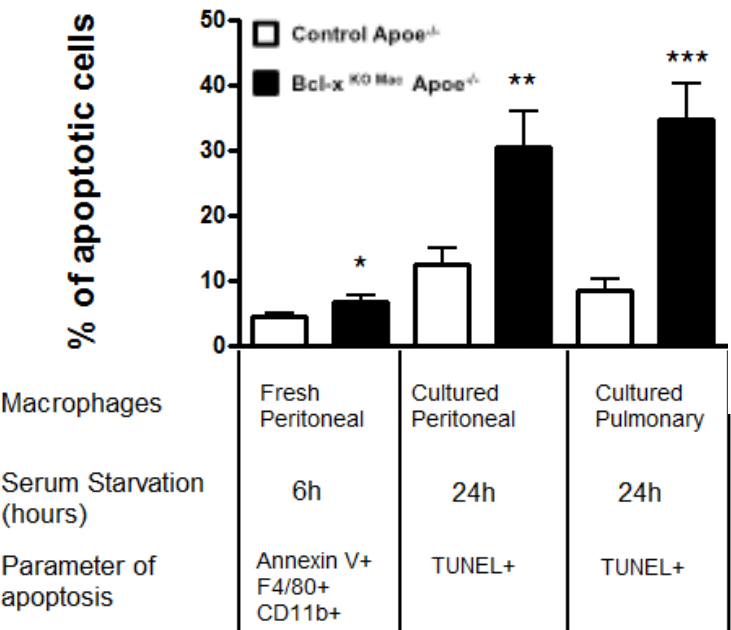


Fig. 4

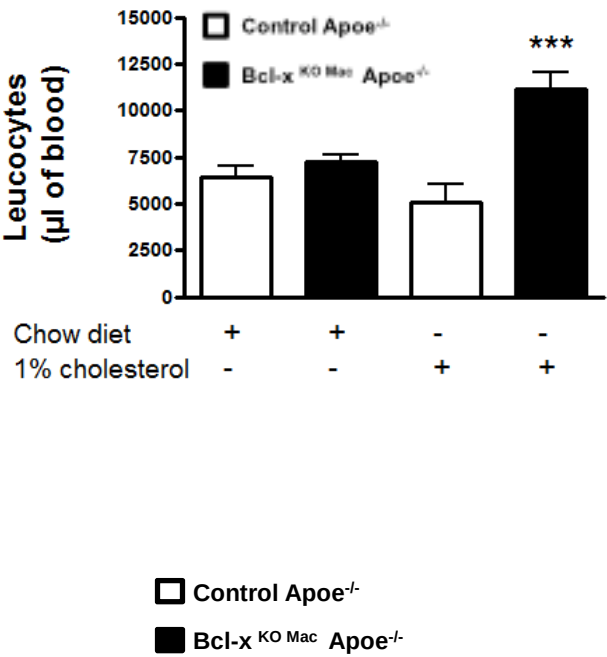


Supplemental Fig. 1

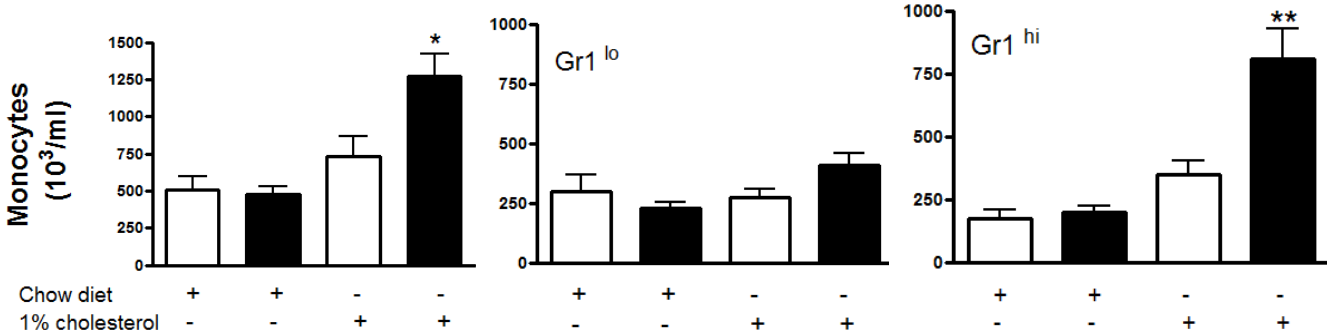
A



B

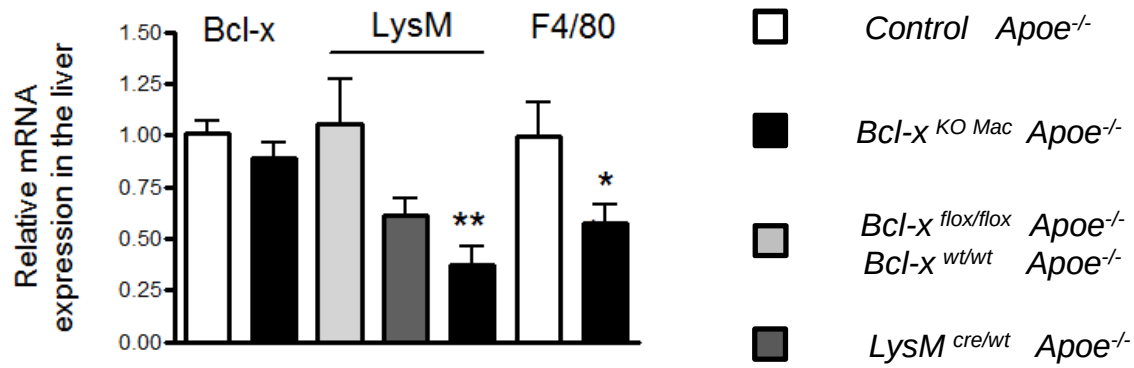


C



Supplemental Fig. 2

A



B

