Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Paris Cardiovascular research Center PARCC

H E G P

Université Paris V – René Descartes

THÈSE DE SCIENCES

Pour l'obtention du titre de Docteur

Discipline : Biologie cellulaire

Sujet de thèse :

Rôle de Clec9a dans l'athérosclérose

Nb de Pages : 163 pages	**Version : 1.0**	**Date : 13/10/2017**
Auteur :	Yacine HADDAD	
Composition du Jury :	Pr. Giulia Chinetti	Rapporteur
	Dr. Laurent Yvan-Charvet	Rapporteur
	Dr. Wilfried Le-Goff	Examinateur
	Pr. Dominique Bonnefont-Rousselot	Examinateur
Projet doctoral dirigé par :	Dr. Soraya Taleb	

Thèse présentée et soutenue publiquement par Yacine HADDAD

Le 13 Octobre 2017

Table des matières :

1 LISTE DES ARTICLES DE THESE 11

1.1 ARTICLES PUBLIES 11
1.2 ARTICLES SOUMIS 11

2 ATHEROSCLEROSE ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES 12

2.1 GENERALITES 12
2.1.1 EPIDEMIOLOGIE 12
2.1.2 FACTEURS DE RISQUE 12
2.1.3 DEFINITION - HISTORIQUE DE L'ATHEROSCLEROSE 13
2.1.4 DEVELOPPEMENT ANATOMO-PATHOLOGIQUE DE L'ATHEROSCLEROSE 14
2.2 MODELES D'ETUDE 17
2.2.1 LA SOURIS APOE-/- 17
2.2.2 LA SOURIS LDLR-/- 18
2.3 PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE 18
2.3.1 STRUCTURE DE LA PAROI VASCULAIRE SAINE 18
2.3.2 GENESE DE LA PLAQUE D'ATHEROME 19
2.3.2.1 Localisation 19
2.3.2.2 Formation de la plaque d'athérome 20
2.3.2.3 Accumulation de LDL au niveau de l'intima 21
2.3.2.4 Activation de l'endothélium et infiltration cellulaire au niveau de l'intima 21
2.3.2.5 Adhésion et Rolling 22
2.3.2.6 Transmigration endothéliale 23
2.3.3 EVOLUTION DE LA PLAQUE 24
2.3.4 ROLE DE L'IMMUNITE 25
2.3.4.1 Immunité innée 25
2.3.4.1.1 Rôle des monocytes dans l'athérosclérose 25
2.3.4.1.2 Rôle des macrophages dans les lésions 27
2.3.4.1.2.1 Origine des macrophages dans les lésions 28
2.3.4.1.2.2 Métabolisme lipidique et formation de cellules spumeuses 30
2.3.4.1.2.3 Macrophages et inflammation 31
2.3.4.1.2.4 Plasticité des macrophages dans l'athérosclérose 32
2.3.4.1.3 Les cellules dendritiques 34

2.3.4.1.3.1 Le développement des DCs 34
2.3.4.1.3.2 Fonctions des cellules dendritiques 35
2.3.4.1.3.2.1 Reconnaissance des Ag (Antigènes) 36
2.3.4.1.3.2.2 Présentation des Ag et activation des LT 36
2.3.4.1.3.2.3 Tolérance 37
2.3.4.1.3.3 Rôle des DCs dans l'athérosclérose 38
2.3.4.1.3.3.1 DC et métabolisme lipidique 38
2.3.4.1.3.3.2 DC et activation des LT 38
2.3.4.1.3.4 Rôle des différentes sous-populations de DCs 39
2.3.4.1.3.4.1 Rôle des pDC 39
2.3.4.1.3.4.2 Rôle des DC-CCL17 41
2.3.4.1.3.4.3 Rôle des DC-CD8α⁺/DC-CD103+ 41
2.3.4.2 Immunité adaptative 43
2.3.4.2.1 Les LT-CD4+ 43
2.3.4.2.1.1 Th1 43
2.3.4.2.1.2 Th2 44
2.3.4.2.1.3 Th17 45
2.3.4.2.1.4 Tregs 46
2.3.4.2.2 Les lymphocytes LT-CD8+ 48
2.3.4.2.3 Cross-presentation 49
2.3.4.2.3.1 Rôle des T-CD8+ dans l'athérosclérose 50
2.3.4.2.4 Les lymphocytes B 54

3 MORT CELLULAIRE ET ATHEROSCLEROSE 57

3.1 AUTOPHAGIE 57
3.2 APOPTOSE 57
3.3 ROLE DE L'APOPTOSE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE 58
3.4 NECROSE & NECROPTOSE 60
3.5 ROLE DE LA NECROPTOSE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE 61
3.6 CLAIRANCE DES CORPS APOPTOTIQUES 63
3.7 ROLE DE L'EFFEROCYTOSE DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE 64

4 LES RECEPTEURS DE « SIGNAUX DANGERS » 67

4.1 LES RECEPTEURS DE TYPE TOLLS (TLRS) 67

4.1.1 GENERALITE 67
4.1.2 SIGNALISATIONS INDUITES PAR LES TLRS 68
4.1.2.1 Signalisation via MYD88 68
4.1.2.2 Signalisation via TRIF 69
4.1.3 TLRS ET ATHEROSCLEROSE 70
4.2 LES RECEPTEURS DE TYPE LECTINE C 74
4.2.1 GENERALITE 74
4.2.2 SIGNALISATIONS INDUITES PAR LES CLRS 75
4.2.3 ROLE DES CLRS DANS L'ATHEROSCLEROSE 76
4.2.3.1 Dectin-1 76
4.2.3.2 LOX-1 77
4.2.3.2.1 Rôle de LOX-1 sur les cellules endothéliales 78
4.2.3.2.2 Rôle de LOX-1 sur les macrophages et les cellules dendritiques 78
4.2.3.2.3 Rôle de LOX-1 sur les cellules musculaires lisses 79
4.2.3.3 MINCLE 80
4.3 LE RECEPTEUR CLEC9A 82
4.3.1 GENERALITE 82
4.3.2 SIGNALISATION 84
4.3.3 FONCTION 84
4.3.4 INTERETS THERAPEUTIQUES DE CLEC9A 85

5 RESULTATS 88

5.1 ROLE DE CLEC9A DANS LE DEVELOPPEMENT DES LESIONS D'ATHEROSCLEROSE 88
5.2 COMPOSITION CELLULAIRE DES LESIONS 90
5.3 ROLE DE CLEC9A DANS L'INFLAMMATION 90
5.4 ROLE DE CLEC9A DANS LES DC-CD8A$^+$ 91
5.1 ARTICLE DE THESE 93
5.2 ROLE DE CLEC9A DANS LES MACROPHAGES 93

6 DISCUSSION 99

6.1 SPECIFICITE DU RECEPTEUR CLEC9A 99
6.2 DIMINUTION DE LA TAILLE DES LESIONS EN L'ABSENCE DE CLEC9A 99
6.3 ROLE DE L'HYPERCHOLESTEROLEMIE SUR L'EXPRESSION DE CLEC9A 101
6.4 AUGMENTATION DE LA PRODUCTION DE L'IL-10 103

6.5 ROLE DES DC-CD8A+ DANS LA PRODUCTION D'IL-10 104

7 CONCLUSION 105

8 ANNEXES 106

8.1 ARTICLE DE THESE 106
8.2 LISTE DES ABREVIATIONS 128
8.3 BIBLIOGRAPHIE 134
8.4 TABLE DES INDEX 160

Table des illustrations :

Figure 1 : Schéma de la classification histologique des différents stades des lésions d'athérosclérose (Stary et al. 1995).....16
Figure 2 : Schéma des différents stades des lésions d'athérosclérose (Virmani et al. 2000) 17
Figure 3 : Structure de la paroi vasculaire saine.....19
Figure 4 : Site de formation des lésions d'athérosclérose (Dr S. Lehoux, Inserm U689) 20
Figure 5 : Rôle du flux sanguin dans la formation des lésions (d'après Malek et al. d'après JAMA 1999) 20
Figure 6 : schéma du recrutement et de la diapédèse leucocytaire.....24
Figure 7 : Rôle de l'inflammation dans le développement de l'athérosclérose 25
Figure 8 : Rôle des monocytes dans l'athérosclérose.....27
Figure 9 : Origine des macrophages dans les lésions.....29
Figure 10 : Rôle des macrophages dans la formation des lésions 32
Figure 11 : Principaux sous-types de macrophages, et leur voies de différenciation, chez l'homme et la souris (De Chinetti-Gbaguidi et al. Nat Rev Cardiol 2015). ..33
Figure 12 : Principaux phénotypes des macrophages dans les plaques humaines en fonction de leurs facteurs de différenciations (adapté de De Chinetti-Gbaguidi et al. Nat Rev Cardiol 2015) 34
Figure 13 : Ontogenèse des cellules dendritiques.....35
Figure 14 : Fonctions physiologiques des cellules dendritiques.....37
Figure 15 : Rôle des cellules dendritiques dans le développement de l'Athérosclérose 42
Figure 16 : Rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose.....48
Figure 17 : Représentation schématique de la cross-presentation (d'après Joffre et al. Nature Rev Immunology 2012).....50
Figure 18 : Rôle pro-athérogène des lymphocytes TCD8 52

Figure 19 : Rôle antiathérogène des LT-CD8+ 54
Figure 20 : Rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose.....56
Figure 21 : représentation des voies majeures de l'apoptose (d'après Hengartner, M. O. et al. Nature 2000).....58
Figure 22 : Signalisation de la nécroptose et rôle dans l'athérosclérose 63
Figure 23 : Efférocytose et athérosclérose.....66
Figure 24 : Signalisation des TLRs 70
Figure 25 : Rôle du TLR4 dans l'athérosclérose.....73
Figure 26 : Famille des récepteurs de type lectine C (adapté de Sousa et al. Annu Rev Immunol. 2012).....76
Figure 27 : Rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose 80
Figure 28 : Structure et signalisation du récepteur clec9a.....82
Figure 29 : Protocole de délétion spécifique de Clec9a dans les DC-CD8α$^+$.....91
Figure 30 : Comparaison de l'expression de Clec9a dans les macrophage et DC-CD8α$^+$ 94
Figure 31 : Expression de Clec9a au niveau des lésions.....95
Figure 32 : Evaluation de la production de l'IL-10 par les macrophages et de la taille des lésions in vivo.....96
Figure 33 : Protocole de délétion spécifique de Clec9a dans les macrophages.....97
Figure 34 : Evaluation du chimérisme dans le sang, dans la rate et dans le péritoine 97
Figure 35 : Evaluation de la délétion de Clec9a dans les macrophages sur le développement de l'athérosclérose 98
Figure 36 : Rôle de la signalisation via SYK dans l'activation des DCs par Clec9a et Dectin-1 (d'après Reis E Sousa C EMBO Mol Med. 2017).....99
Figure 37 : Hypothèse sur le mécanisme de Clec9a sur la taille des plaques 101
Figure 38 : Hypothèse sur la modulation de l'expression de Clec9a par le cholestérol 102

Remerciements

Avant toute chose, ce projet doctoral ayant nécessité tout au long de sa durée l'aide et le soutien de nombreuses personnes, je souhaiterais donc remercier toutes celles et ceux que je n'aurais pas mentionnés dans cette partie par oubli.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à ma directrice de thèse, Soraya Taleb, pour toute son aide. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury, en particulier, Dr Giulia Chinetti et Dr. Laurent Yvan-Charvet pour avoir acceptés d'être rapporteurs, ce qui n'est pas moindre étant donné le temps considérable que cette fonction requiert. Je vous remercie donc pour ce temps que vous avez consacré à la lecture de ma thèse et pour toute votre expertise.

De même, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Wilfried Le-Goff et au Pr. Dominique Bonnefont-Rousselot qui m'ont fait l'honneur d'être examinateurs de ma thèse, en m'accordant de votre temps vous avez contribué à l'aboutissement de mon travail, et pour cela je vous en suis reconnaissant.

Je sais infiniment gré au Dr Alain Tedgui, directeur du centre de recherche PARCC HEGP et co-directeur de l'équipe 5, pour sa participation scientifique ainsi que le temps qu'il a consacré à ce projet. J'ai été extrêmement sensible face à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je voudrais également remercier le Pr Ziad Mallat, co-directeur de l'équipe 5, qui s'est impliqué dans ce projet et m'a orienté efficacement dans mes recherches. Vos conseils judicieux m'ont permis d'avancer et de progresser.

Au Dr Hafid Ait Oufella, je tiens à lui adresser mes remerciements pour toutes ces discussions enrichissantes que l'on a partagé mêlant travail et humour. Je te remercie pour ton aide tant sur le plan professionnel que personnel. J'ai pu compter sur toi lorsque j'en avais besoin.

Je tiens aussi à exprimer le plaisir que j'ai eu à travailler avec tous les collègues du laboratoire. En particulier pour avoir instauré un environnement de travail convivial et accueillant.

Je souhaite exprimer ma gratitude à l'égard de mes amis ! J'ai toujours pu compter sur votre aide et votre disponibilité, en particulier dans les moments difficiles.
Ils font partie de ces gens que l'on rencontre une fois dans sa vie et qui n'en sorte plus jamais.

Et ceux que je souhaite remercier par-dessus tout, ceux qui me sont les plus chères et qui m'ont conduit jusqu'à ce jour mémorable : ma famille !

A ma chère maman, tu es le pilier fondateur de ce que je suis et de ce que je fais, tu m'encourages sans cesse à me dépasser et à atteindre ce que j'imaginais infranchissable, c'est avec la plus grande humilité que je te dédie toute mes réussites passées et futures.

A mon papa, mon soutien constant et infaillible, je te remercie de m'avoir sorti du lit durant toutes ces années, malgré mes nombreuses plaintes, tu es et restera le plus efficace des réveils. Je te remercie également pour ces nombreuses longues nuits durant lesquelles tu m'accompagnais par solidarité, avec comme seul compagnon de route, notre café.

A mon frère, (premier correcteur de cette thèse !) pour son intérêt à l'égard de mes travaux, sa pertinence m'a été d'une grande aide pour préciser et affiner mes propos.

Cette thèse et moi-même te devons beaucoup. Merci.

Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Pour clore ce préambule, je souhaiterais laisser un mot aux étudiants qui seraient susceptible de lire ce manuscrit. Ce que je pourrais vous conseiller, en toute humilité, serait de ne jamais abandonner un travail entamé, la persévérance est la clé de la réussite, si vous n'en voyez pas les fruits c'est que l'arbre n'est pas encore mûr. Donc soyez patient et endurez, c'est dans l'adversité que l'on réalise les plus grands exploits.

1 LISTE DES ARTICLES DE THESE

1.1 Articles publiés

The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Promotes the Development of Atherosclerosis in Mice.

Haddad Y, Lahoute C, Clément M, Laurans L, Metghalchi S, Zeboudj L, Giraud A, Loyer X, Vandestienne M, Wain-Hobson J, Esposito B, Potteaux S, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z, Taleb S.

Circ Res. 2017 Jul 21;121(3):234-243. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310960. Epub 2017 Jun 12.

Indoleamine 2,3-Dioxygenase Fine-Tunes Immune Homeostasis in Atherosclerosis and Colitis through Repression of Interleukin-10 Production.

Metghalchi S, Ponnuswamy P, Simon T, **Haddad Y**, Laurans L, Clément M, Dalloz M, Romain M, Esposito B, Koropoulis V, Lamas B, Paul JL, Cottin Y, Kotti S, Bruneval P, Callebert J, den Ruijter H, Launay JM, Danchin N, Sokol H, Tedgui A, Taleb S, Mallat Z.

Cell Metab. 2015 Sep 1;22(3):460-71. doi: 10.1016/j.cmet.2015.07.004. Epub 2015 Jul 30.

1.2 Articles soumis

Indoleamine 2-3 dioxygenase shapes microbiota to reduce IL-22 and promote metabolic disease

Ludivine Laurans[1], Nicolas Venteclef[2], **Yacine Haddad[1]**, Sarvenaz Metghalchi[1], Bruno Sovran[3], Raphael GP Denis[4], Julien Dairou[5], Fawaz Alzaid[2], Marjolene Straub[3], Sarah Jegou[3], Claire McQuitty[3], Bruno Esposito[1], Thomas Viel[1], Bertrand Tavitian[1], Jacques Callebert[5], Serge Luquet[4], Massimo Federici[6], José Manuel Fernandez-real[7], Remy Burcelin[8], Jean-Marie Launay[5], Alain Tedgui, Ziad Mallat[1], Harry Sokol[3], Soraya Taleb[1]

2 ATHEROSCLEROSE ET MALADIES CARDIOVASCULAIRES

2.1 Généralités

2.1.1 Epidémiologie

L'ensemble des maladies cardiovasculaires (dont l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux) représentaient environ 17 millions de décès dans le monde en 2013, soit la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde, devant les cancers[1, 2]. De plus, selon les estimations, ces pathologies resteront la première cause de mortalité dans le monde en 2030 responsable de près de 23 millions de décès. En France, 29% de la mortalité totale est imputée aux maladies cardiovasculaires avec 170 000 décès chaque année, derrière les cancers qui représentent 30% de la mortalité totale. D'autre part, les maladies cardiovasculaires engendrent également des séquelles importantes chez les malades dont les conséquences sont considérables. En effet, les accidents vasculaires cérébraux représentent, par exemple, la première cause de handicap. Ainsi, les dépenses annuelles de santé remboursées liées aux maladies cardiovasculaires représentent environ 20% des dépenses totales, avec plus de 30 milliards d'euros, soit deux fois plus que les cancers.

L'athérosclérose est la principale cause sous-jacente aux maladies cardiovasculaires, et les conséquences socio-économiques qui en découlent font de cette pathologie un problème majeur de santé publique.

2.1.2 Facteurs de risque

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle et l'observation de population a permis de mettre en évidence l'existence de facteurs de risque pouvant prédisposer à l'apparition et le développement de l'athérosclérose. On distingue des facteurs modifiables et des facteurs non-modifiables.

Parmi les facteurs non-modifiables on retrouve l'âge, le sexe et l'hérédité. Le risque d'accident cardiovasculaire est d'autant plus important avec l'âge. Les hommes sont plus susceptibles aux accidents cardiovasculaires que les femmes avant la ménopause, la prévalence tend à s'équilibrer après 75 ans[3-6].

Les facteurs modifiables concernent tous les facteurs pouvant faire l'objet d'une prévention primaire ou secondaire. Parmi ceux-ci on retrouve l'hypertension artérielle, les dyslipidémies et l'hypercholestérolémie. Cette dernière représente le facteur le plus important dans le développement de l'athérosclérose. Le diabète, l'obésité, la sédentarité, la consommation excessive d'alcool et le tabagisme contribuent également aux complications liées à l'athérosclérose[7, 8].

La prévention des facteurs de risque modifiables représente donc un enjeu important afin de limiter le développement de l'athérosclérose.

2.1.3 Définition - Historique de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique clairement associée à un mode vie de type occidental, qui est notamment caractérisé par la sédentarité et une alimentation riche en matières grasses. Pourtant, il ne s'agit pas d'une maladie nouvelle. En effet, les études de Ruffer en 1911 et de Randall Thompson en 2013, ont permis de mettre en évidence la présence de lésions d'athérosclérose sur des momies égyptiennes, dont les plus anciennes datent de plus de 3 000 ans[9]. Pour décrire les lésions, le terme « athérome » qui vient du grec ancien « athara » et qui signifie « bouillie de farine ou gruau » a été introduit par Haller en 1755. Le caractère inflammatoire de la maladie a été souligné en 1856 par Virchow. Ce n'est qu'en 1904 que les premières descriptions précises de la maladie ont été faites, par Felix Marchand, qui invente par ailleurs le terme « atherosklerose » issu du grecs « athara » (« bouillie de farine ou gruau ») et « skleros » (« dur »). Ce nom permet ainsi de mettre en évidence les deux composants essentiels, athéromateuse et scléreuse, de la maladie. Enfin, l'athérosclérose a été définie pour la première fois en

1954 par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), comme une « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang, et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média ».

2.1.4 Développement anatomo-pathologique de l'athérosclérose

Afin de comprendre et d'expliquer les mécanismes aboutissant à la formation de la plaque d'athérosclérose et des accidents cliniques qui en découlent, il est important de connaître les différents stades d'évolution de la maladie. La première classification anatomo-pathologique détaillée des stades successifs de l'évolution de l'athérosclérose a été proposée par Stary en 1992 dans le cadre du « Committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis » (Figure 1). Celle-ci a été adoptée par l'AHA (American Heart Association) en 1994[10, 11]. Cette classification repose sur l'observation d'un grand nombre d'artères d'enfants et de jeunes adultes et comporte six stades. On distingue les lésions précoces correspondant aux stades de type I à III et qui évoluent de manières silencieuses. Aux lésions avancées, qui correspondent aux stades IV à VI, l'épaississement de l'intima entraine une diminution de la lumière artérielle. On peut également y observer des phénomènes de complications, tels que l'ulcération, l'hémorragie intra-plaque ou la formation d'un thrombus, pouvant accélérer l'évolution de la maladie.

Lésions de type I ou macrophages spumeux isolés. Il s'agit du stade initial, les lésions sont de petites tailles et ne sont pas visibles à l'œil nu. Ce stade est caractérisé par un épaississement de l'intima et la présence de macrophages spumeux isolés.

Lésions de type II ou strie lipidique. Il s'agit des premières lésions observables à l'œil nu, et apparaissent dès l'âge de 10-15 ans. Les macrophages spumeux qui forment la strie lipidique se regroupent en amas dans le sous-endothélium de l'intima. On

n'observe pas encore de lipides extracellulaires. Les lésions sont jaunâtres de formes allongées et planes, et sont disposées parallèlement au flux sanguin.

Lésions de type III ou pré-athérome. Ces lésions sont similaires aux lésions de type II, mais avec l'apparition de dépôts aléatoires de lipides extracellulaires, près des macrophages spumeux. Le noyau lipidique n'étant pas encore formé.

Lésions de type IV ou athérome. L'accumulation de lipides extracellulaires est beaucoup plus importante et forme un noyau lipidique, également riche en cristaux de cholestérol mais pauvre en cellules. Ce noyau est dépourvu d'une réelle chape fibreuse.

Lésions de type V ou plaque d'athérosclérose. Ces lésions se développent avec l'âge et apparaissent vers 40 ans. Ce stade est également appelé plaque fibrolipidique ou plaque fibroathéromateuse. Il est caractérisé par la formation de la chape fibreuse riche en collagènes, protéines de structure et cellules vasculaires (en particulier les cellules musculaires lisses). Cette chape fibreuse entoure un centre/noyau lipidique constitué de cellules spumeuses, de débris cellulaires, de lipides extracellulaires et de cristaux de cholestérol. La plaque d'athérosclérose, de couleur jaunâtre, peut se prolonger dans la lumière artérielle.

Lésions de type VI ou lésions compliquées. Ces lésions surviennent généralement après 40 ans. Il s'agit de l'évolution des stades IV ou V vers une complication. La taille de la plaque n'est pas forcément corrélée à l'apparition de complications. Ainsi, une complication qui survient sur une plaque peu sténosante peut être lourde de conséquences car difficilement détectable préalablement par des examens classiques de cardiologie. L'évaluation des lésions se faisant généralement à partir de la taille des plaques et rarement de leur structure.

Les lésions compliquées peuvent évoluer vers des symptômes et également être à l'origine d'accidents aigus comme l'infarctus du myocarde. L'AHA distingue différents types de lésions compliquées :

- La lésion VIa (l'ulcération) correspond à une rupture de plaque avec perte de l'endothélium vasculaire et donc exposition du sous-endothélium (ulcération). La profondeur de l'ulcération est variable, elle peut être superficielle et se limiter à la chape fibreuse ou être plus profonde et atteindre le noyau lipidique.
- La lésion VIb (hématome ou hémorragie intra-plaque) survient plus fréquemment et peut être responsable de symptômes cliniques. Elle peut être associée à l'ulcération qui entraine l'arrivée de sang de la lumière vers la plaque ou peut être induite suite à la rupture de vaisseaux intra-plaque sous l'effet de contraintes hémodynamiques.
- La lésion VIc (Thrombose) est la complication majeure de l'athérosclérose. La thrombose peut intervenir indépendamment de la taille de la plaque, suite à une ulcération superficielle ou profonde. Elle peut être occlusive ou non, ce facteur détermine le degré de gravité des symptômes cliniques.

La lésion VIabc possède les caractéristiques des trois précédentes lésions.

Figure 1 : Schéma de la classification histologique des différents stades des lésions d'athérosclérose (Stary et al. 1995)

Cette classification repose sur le fait que les lésions évoluent linéairement vers le stade dont le degré de gravité est le plus important. Cependant celle-ci a récemment été remise en cause. En effet, il a été montré que les lésions pouvaient évoluer par poussée sans forcément passer par toutes les étapes décrites précédemment. Ainsi, en 2000 Virmani et Schwart proposent une nouvelle classification faite à partir de l'observation de plaques de patients décédés subitement de maladies coronariennes (Figure 2). Cette nouvelle classification, descriptive, repose sur l'analyse du contenu lipidique, de la formation de la chape fibreuse et du centre nécrotique mais aussi en se basant sur l'évolution dynamique de l'épaisseur de la chape fibreuse, de la taille

du centre nécrotique et de la thrombose. Elle diffère de la précédente sur plusieurs points. Tout d'abord, les premiers stades ne sont pas considérés comme pathologiques. Le stade « lésions intimales » de la classification de Stary a été remplacé par « Xanthome intimal ». Les lésions peuvent se compliquer sans forcément passer par tous les stades de la maladie.

Figure 2 : Schéma des différents stades des lésions d'athérosclérose (Virmani et al. 2000)

2.2 Modèles d'étude

2.2.1 La souris ApoE-/-

L'ApoE (Apolipoprotéine E) est une molécule synthétisée dans différents tissus comme le cerveau, le foie ou la rate. Elle est présente au niveau de la plupart des lipoprotéines comme les ILDLs (Intermediate Density Lipoprotein ou lipoprotéines de densité intermédiaire) dont elle permet leur transport et leur récupération au niveau du foie[12]. L'invalidation de l'ApoE chez des souris (souris $ApoE^{-/-}$) modifie considérablement leur profil lipidique. On observe une augmentation importante des taux de VLDLs (Very Low Density Lipoprotein ou lipoprotéines de très faible densité), ILDLs et de LDLs (Low Density Lipoprotein ou lipoprotéines de faible densité) ainsi qu'une diminution des taux de HDLs (High Density Lipoprotein ou lipoprotéine de haute densité)[13]. Au niveau des lésions, les souris $ApoE^{-/-}$ (Apolipoprotéine E knockout) développent spontanément des plaques d'athérosclérose au niveau de l'aorte ainsi qu'aux bifurcations aortiques, il s'agit d'une distribution qui est similaire aux lésions observées chez l'homme. Entre 6 et 10 semaines, les souris développent des lésions équivalentes au stade « strie lipidique » contenant des cellules spumeuses et des CMLs (Cellules Musculaires Lisses). Aux stades avancés, ces souris peuvent développer la formation d'un centre lipidique entouré d'une chape

fibreuse[14]. Par ailleurs, le développement et la progression des lésions peuvent être accélérés par un régime hyper-lipidique.

Néanmoins, ce modèle possède certaines limites. En effet, les taux très élevés en cholestérol plasmatique ainsi que les propriétés anti-inflammatoires de l'ApoE restent critiquables[15].

2.2.2 La souris LDLr-/-

Le deuxième modèle le plus utilisé est le modèle de souris déficientes pour le récepteur aux LDLs, la souris LDLr$^{-/-}$ (Low Density Lipoprotein receptor). Contrairement aux souris ApoE$^{-/-}$, les souris LDLr$^{-/-}$ ne développent pas spontanément des plaques avec un régime normal et présentent une hypercholestérolémie modérée[16]. Sous régime hyper-lipidique, ces souris sont caractérisées par des taux plasmatiques élevés de LDLs, proche de l'hypercholestérolémie familiale que nous retrouvons chez l'homme. Par ailleurs, elles développent rapidement des plaques[17].

2.3 Physiopathologie de l'athérosclérose

2.3.1 Structure de la paroi vasculaire saine

La paroi des vaisseaux est constituée de 3 couches distinctes, de la couche la plus interne à la plus externe : l'intima, la média et l'adventice (Figure 3). Chacune de ces tuniques est séparée l'une de l'autre par des membranes élastiques : la limitante élastique interne, sépare l'intima de la média, et la limitante élastique externe, plus faible, sépare la média de l'adventice.

L'intima, qui est la tunique la plus interne est directement en contact avec le flux sanguin. Cette couche est tapissée de cellules endothéliales formant l'endothélium. Ce dernier est impliqué dans différentes fonctions tels que la régulation de l'hémostase et l'inflammation.

La média est la tunique moyenne, la plus épaisse. Elle est limitée de part et d'autre par les membranes limitantes élastiques interne et externe. Elle est composée de

cellules musculaires lisses et d'un réseau de collagène, d'élastine, et de mucopolysaccharides. Suivant la prédominance de fibres élastiques ou de cellules musculaires. Nous distinguons les artères élastiques, qui sont de gros vaisseaux proximaux, opposées aux artères musculaires, qui sont les petites artères périphériques particulièrement douées de vasomotricité.

L'adventice est la tunique externe formée de tissu conjonctif peu organisé. Elle contient également des fibres élastiques épaisses et des fibroblastes.

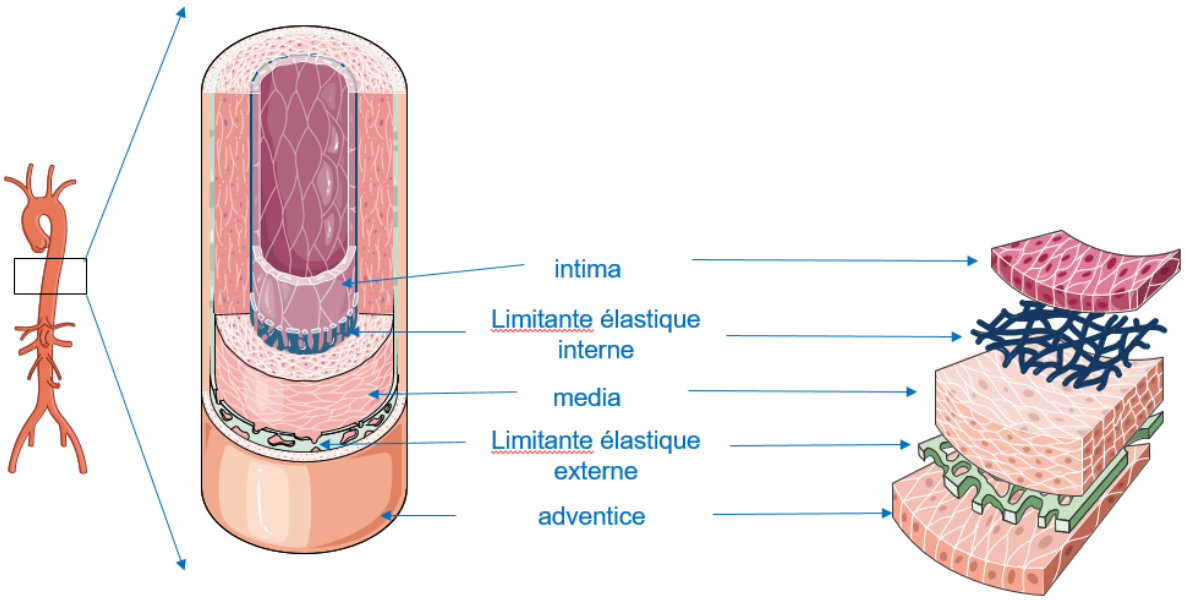


Figure 3 : Structure de la paroi vasculaire saine

2.3.2 Genèse de la plaque d'athérome

2.3.2.1 *Localisation*

Les plaques d'athérosclérose se développent principalement dans les vaisseaux de moyen et gros calibre, et plus particulièrement au niveau des bifurcations et des zones de courbure, comme au niveau de la crosse aortique (Figure 4). Ces zones, pro-athérogènes, sont caractérisées par un flux sanguin oscillatoire ou turbulent où les contraintes de cisaillement sont faibles. Les cellules endothéliales possèdent une grande variété de récepteurs, comprenant entre autres des mécano-senseurs, capables de capter un signal mécanique (flux sanguin) susceptibles d'engendrer des

modifications fonctionnelles et phénotypiques au niveau de l'endothélium vasculaire. En effet, il a été montré, que les régions pro-athérogènes, caractérisées par un flux sanguin non laminaire, sont associées à une dysfonction endothéliale, à une augmentation de la perméabilité, de la prolifération cellulaire mais aussi des fonctions adhésives et coagulantes[18]. Au niveau des zones antiathérogènes, le flux sanguin est laminaire, les contraintes de cisaillement sont plus importantes, la fonction endothéliale n'est pas affectée c'est-à-dire que l'endothélium est imperméable aux cellules circulantes et les fonctions procoagulantes et prolifératives sont régulées[19] (Figure 5).

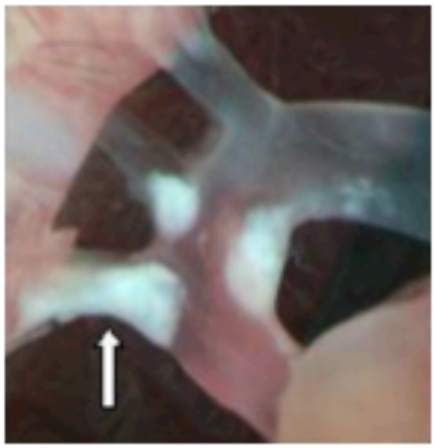


Figure 4 : Site de formation des lésions d'athérosclérose (Dr S. Lehoux, Inserm U689)

Figure 5 : Rôle du flux sanguin dans la formation des lésions (d'après Malek et al. d'après JAMA 1999)

2.3.2.2 *Formation de la plaque d'athérome*

Les lésions d'athéroscléroses se développent au niveau de l'intima de la paroi vasculaire. Initialement, les cellules endothéliales de l'intima ne permettent pas aux

leucocytes circulant d'adhérer à la paroi des vaisseaux. Le premier stade de la physiopathologie est caractérisé par une dysfonction endothéliale. Cette phase est également appelée « Strie lipidique ». Elle est divisée en différentes étapes : infiltration de LDLs, activation endothéliale et recrutement des leucocytes circulants[20](Figure 7).

2.3.2.3 *Accumulation de LDL au niveau de l'intima*

En situation non pathologique, il existe un équilibre entre les concentrations de LDLs plasmatiques et intracellulaires de la paroi artérielle.

Les LDLs sont des lipoprotéines constituées entre autres de l'Apolipoprotéine B-100, de phospholipides, de triglycérides et de molécules liposolubles antioxydantes et dont la fonction principale et de transporter le cholestérol. Les LDLs peuvent se fixer au sous-endothélium et plus particulièrement à la matrice extracellulaire (MEC) via l'interaction avec les protéoglycanes[21].

Sous l'influence des facteurs de risque précédemment décrits, plus la concentration plasmatique de LDLs augmente et plus la concentration de LDLs retenus dans le sous-endothélium est importante.

La liaison des LDLs aux protéoglycanes de la MEC entraine des modifications lipidiques et structurelles des LDLs les rendant susceptibles à l'oxydation. Les OxLDLs (Oxidized Low-Density Lipoprotein) induisent une augmentation de la production de protéoglycanes par les CMLs entrainant davantage leur rétention au niveau de la MEC.

2.3.2.4 *Activation de l'endothélium et infiltration cellulaire au niveau de l'intima*

L'une des étapes clés de la phase précoce du développement de l'athérosclérose est l'activation de l'endothélium vasculaire qui va conduire à une accumulation de

cellules circulantes au niveau de l'intima. Cette infiltration cellulaire se fait en plusieurs étapes(Figure 6).

2.3.2.5 *Adhésion et Rolling*

Cette première étape de l'infiltration leucocytaire intimale met en jeu différentes molécules dont les sélectines P-selectines, E-selectines[22] qui sont exprimées par les cellules endothéliales (la P-selectine est également exprimée par les plaquettes activées) et la L-selectine, exprimée par les leucocytes. De plus, Il a été montré que les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF□ (Tumor Necrosis Factor □) ou l'IL1-b (Interleukin 1 beta), les OxLDL[23] et la perturbation du flux sanguin[24] peuvent induire l'expression de la P-selectine et la E-selectine. Ces sélectines sont des molécules transmembranaires et calcium-dépendantes. C'est l'interaction des sélectines avec leurs ligands glycosylés qui permet le rolling des cellules. En effet, la P- et E-selectine peuvent interagir avec le PGSL-1 (P-Selectine Glycoprotein Ligand 1), ligand exprimé de façon constitutive par les leucocytes. La E-sélectine peut également interagir avec le ESL-1 (E-Selectine Ligand 1). Le rolling fait également intervenir des forces d'interactions entre les sélectines et leurs ligands qui sont rapidement réversibles.

Le rôle important des sélectines dans le développement de l'athérosclérose a été démontré à partir de modèles murins ou la déficience en P et E-selectine chez des souris $LDLr^{-/-}$ et $ApoE^{-/-}$ entraine une augmentation de la taille des lésions[25, 26].

Les sélectines ne sont pas les seules molécules impliquées dans l'adhésion et le rolling des leucocytes au niveau de l'endothélium. Les intégrines et les molécules de la famille des CAMs (Cell Adhesion Molecule) sont également engagées. VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) est exprimé par l'endothélium vasculaire seulement après leur activation (par les cytokines pro-inflammatoires ou OxLDLs)[27]. ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) est exprimée de façon constitutive par les cellules endothéliales. VCAM-1 interagit avec son ligand VLA-4 (Very Late Antigen-4 $\alpha_4\beta_1$ integrin) et CD44 (Cluster of Differenciation 44) pour jouer

un rôle important dans l'adhésion des monocytes avec l'endothélium. La forte adhésion des monocytes à l'endothélium est aussi régulée par les chimiokines telles que CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2) et l'IL-8. Alors que ICAM-1 et 2 interagissent avec LFA-1 (Lymphocyte Fonction-associated Antigen-1) et Mac-1 (Macrophage-1-antigen) pour réguler le déplacement des monocytes sur l'endothélium vasculaire.

Des études ont montré que l'invalidation de ICAM-1 chez des souris ApoE$^{-/-}$ entraine une diminution de la taille des lésions[28]. L'invalidation de VCAM-1 étant létale, des études, visant à réduire de façon importante son expression, ont mis en évidence un rôle pro-athérogène de VCAM-1 chez la souris LDLr$^{-/-}$[29].

2.3.2.6 *Transmigration endothéliale*

Suite à l'adhésion et au rolling sur l'endothélium, les leucocytes vont transmigrer dans le sous endothélium. La transmigration fait intervenir des molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines telles que les PECAM1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) qui sont localisées au niveau des jonctions intercellulaires de l'endothélium mais aussi au niveau des leucocytes et des plaquettes. Les molécules ICAMs, et les JAMs (junctional adhesion molecule) ainsi que des molécules non-immunoglobulines comme CD99 sont exprimées par les leucocytes. Au cours de ce mécanisme, les leucocytes traversent l'endothélium via les jonctions entre cellules endothéliales (diapédèse).

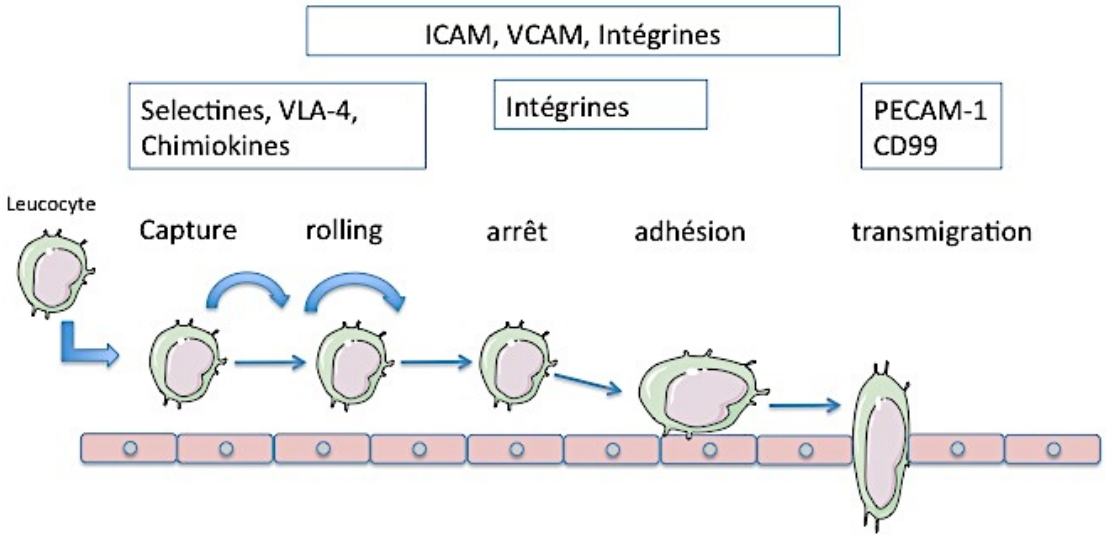


Figure 6 : schéma du recrutement et de la diapédèse leucocytaire.

2.3.3 Evolution de la plaque

La plaque évolue vers une plaque caractérisée par la formation d'un centre nécrotique et d'une chape fibreuse. Les CMLs et la MEC jouent un rôle important dans la stabilité de la plaque. En effet, l'évolution de la plaque est conditionnée par la MEC, les MMPs (Métalloprotéinases) et la composition en CMLs. Les CMLs migrent de la média vers l'intima et acquièrent un phénotype sécrétoire où elles synthétisent du collagène et forment la chape fibreuse. L'épaisseur de cette chape est un facteur critique. Les plaques instables sont caractérisées par un amincissement de la chape fibreuse, dû aux cytokines pro-inflammatoires (particulièrement l'IFNγ (Interferon Gamma))[30] et à la dégradation de la MEC par les MMPs[31, 32].

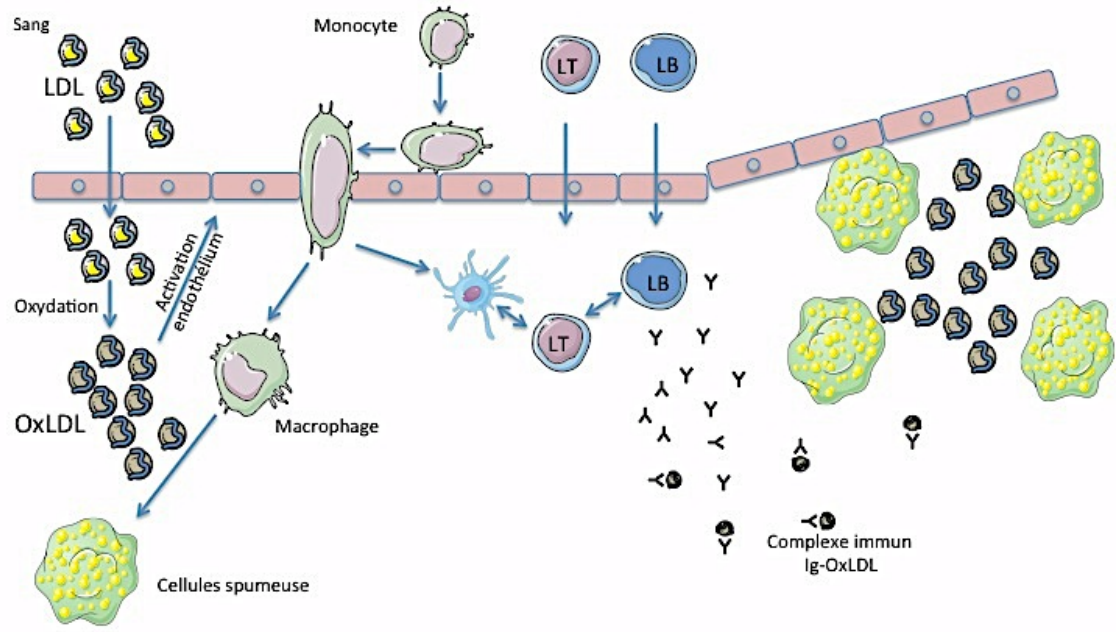


Figure 7 : Rôle de l'inflammation dans le développement de l'athérosclérose

2.3.4 Rôle de l'immunité

2.3.4.1 *Immunité innée*

2.3.4.1.1 Rôle des monocytes dans l'athérosclérose

Chez la souris, il existe deux populations de monocytes caractérisées par l'expression de marqueurs spécifiques et de récepteurs aux chimiokines. Les monocytes Ly6C^{hi} ou « monocytes classiques » caractérisés par l'expression CCR2 et les monocytes non classiques Ly6C^{lo} caractérisés par l'expression de CX_3CR1[33]. Le rôle des monocytes dans l'athérosclérose a été mis en évidence à travers l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs qui détermine leur recrutement au niveau des lésions (Figure 8).

La présence de monocytes au niveau des lésions chez l'homme et chez la souris suggère un rôle potentiel dans le développement de l'athérosclérose[34].

Les souris ApoE$^{-/-}$ sous régime gras sont caractérisées principalement par une augmentation de monocytes classiques Ly6C^{hi}[35, 36].

L'injection d'un anticorps neutralisant anti-CCR5 à des souris ApoE$^{-/-}$ entraine un défaut d'infiltration de monocytes non classiques au niveau des lésions[35]. Ce qui

montre que le CCR5 est important pour le recrutement des monocytes non classiques au niveau des lésions.

L'invalidation de CCL2, qui est le ligand du CCR2 ou de CX_3CR1 dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ entraine une diminution de la taille des lésions par rapport aux souris contrôles $ApoE^{-/-}$[37]. Les auteurs montrent également un rôle additif des deux populations monocytaires dans l'évolution des lésions. En effet, des souris $ApoE^{-/-}CCL2^{-/-}CX_3CR1^{-/-}$ développent moins de plaques par rapport aux souris $ApoE^{-/-}CCL2^{-/-}$ ou par rapport aux souris $ApoE^{-/-}CX_3CR1^{-/-}$ après 25 semaines de régime normal. De plus, L'injection d'un anticorps neutralisant anti-CCR5 à des souris $ApoE^{-/-}CCL2^{-/-}CX_3CR1^{-/-}$, réduit davantage le taux de monocytes circulants et diminue la taille des lésions. Ces résultats suggèrent donc un rôle pro-athérogène des deux populations de monocytes[37].

Chez l'homme, trois populations de monocytes ont été identifiées :

- Les monocytes classiques $CD16^{-}CD14^{++}$ caractérisés par :
    - L'expression du CCR2 ;
    - La production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF□, l'IL-1□ ou l'IL-6[38]
- Les monocytes non classiques $CD14^{-}CD16^{+}$ caractérisés par :
    - L'expression du récepteur CX_3CR1 ;
    - Une faible capacité de phagocytose[39]
- Les monocytes intermédiaires $CD16^{int}CD14^{++}$ caractérisés par :
    - L'expression des molécules du CMH-II, suggérant un rôle dans la présentation d'antigènes, et qui pourraient être les précurseurs de macrophages ou de cellules dendritiques[40].

Par ailleurs, l'expression de CCR2 et de CX_3CR1 qui sont présents sur les monocytes humains suggère un rôle important des monocytes. Par exemple, nous retrouvons chez les patients atteints de coronaropathie, une augmentation de monocytes $CD14^{+}CD16^{+}$ par rapport aux sujets sains.

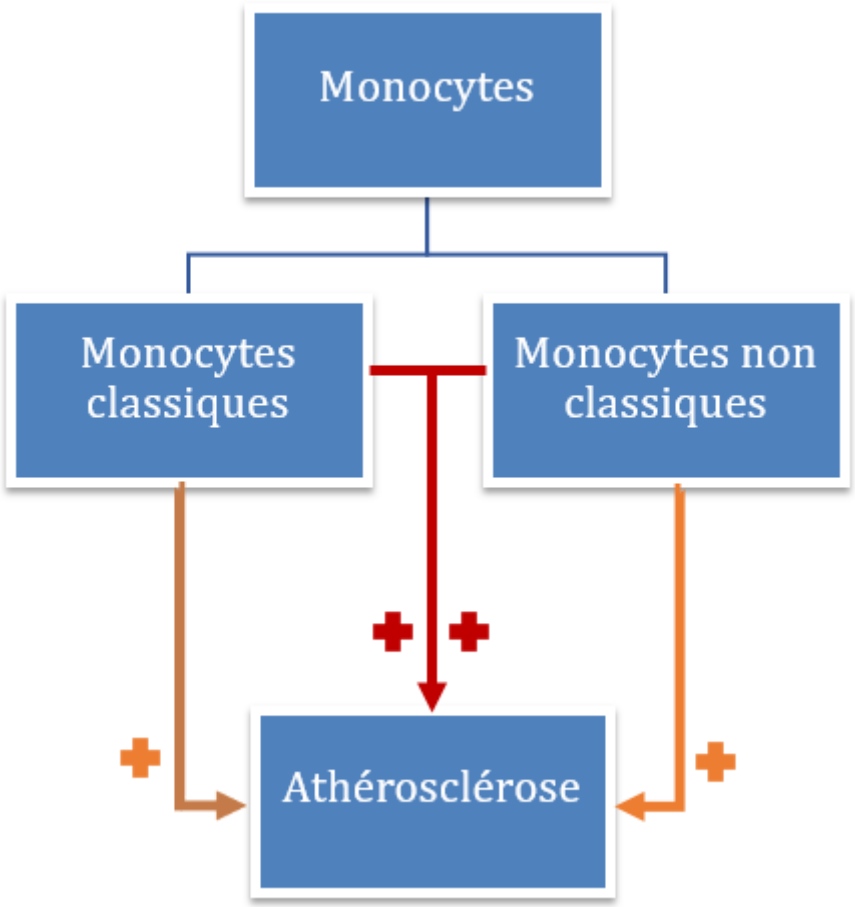


Figure 8 : Rôle des monocytes dans l'athérosclérose

2.3.4.1.2 Rôle des macrophages dans les lésions

Les macrophages constituent une population hétérogène de cellules myéloïdes. Ils sont essentiels pour maintenir l'homéostasie tissulaire et représentent la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Les macrophages sont également impliqués dans le remodelage tissulaire après une lésion ou lors du développement des organes. Par ailleurs, ces macrophages possèdent également une grande plasticité et des caractéristiques fonctionnelles très diverses selon le tissu et le contexte inflammatoire.

Le rôle majeur des macrophages dans l'athérosclérose a été mis en évidence à partir de modèles murins déficients en M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), les

souris op/op. La déficience en M-CSF entraine une diminution du nombre de macrophages tissulaires et de monocytes circulants. Il a été montré que la déficience en M-CSF chez des souris ApoE$^{-/-}$ ou LDLr$^{-/-}$ entraine une diminution importante de la taille des lésions.

Les macrophages représentent la proportion cellulaire la plus importante au sein des lésions. Ils interviennent à tous les stades du développement de l'athérosclérose et sont impliqués tant dans la modulation de l'inflammation qu'au niveau du métabolisme des lipides et à la formation des cellules spumeuses (Figure 10).

L'origine des macrophages au sein des lésions est multiple, ils peuvent être issus de la différenciation de monocytes circulants, soit de la différenciation de progéniteurs cellulaires résidents déjà présents dans la paroi vasculaire.

2.3.4.1.2.1Origine des macrophages dans les lésions

L'accumulation des macrophages au sein des lésions a été mise en évidence tant au niveau des lésions chez l'homme que chez la souris[41, 42]. . Seulement l'origine de leur accumulation n'est pas encore clairement établie et plusieurs hypothèses ont été émises (Figure 9).

Chez la souris, de nombreuses études montrent que la majorité des macrophages au niveau des lésions provient en grande partie de la différentiation des monocytes circulants[36, 43, 44]. Récemment l'émergence d'une nouvelle hypothèse a été émise selon laquelle les macrophages pourraient proliférer localement. Robbins CS et al. suggèrent que l'origine monocytaire des macrophages représente une proportion très importante aux stades précoces alors qu'aux stades avancés, près de 90% des macrophages proviendraient plutôt d'une prolifération locale[45]. Parallèlement à ces résultats, Ensan S et al. révèlent l'existence de précurseurs embryonnaires CX3CR1^{+} qui peuvent potentiellement participer à la prolifération locale des macrophages au niveau des artères[46]. Cependant, Childs et al. ont mis en évidence qu'il existe une proportion importante de macrophages sénescents aux stades avancés[47]. Ces macrophages ne peuvent donc plus proliférer, et leur déplétion entraine une

diminution significative de l'infiltrat macrophagique aux stades avancés[47]. Dans une autre étude, les auteurs montrent une prolifération locale des macrophages, indépendamment des monocytes, plus importante aux stades précoces qu'aux stades tardifs[48]. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'utilisation de marqueurs présents aussi bien dans les macrophages qu'au niveau des CMLs. Les résultats d'une étude récente montrent que près de 50% des marqueurs exprimés par les macrophages spumeux humains, sont également présents au niveau des CMLs, in vitro et in situ[49]. Tout comme les macrophages, les CMLs possèdent des capacités prolifératives importantes et une grande plasticité, pouvant même acquérir un phénotype proche de celui des macrophages. En effet, certaines études proposent que, dans des conditions particulières, les CMLs peuvent se différencier en macrophages appelés « macrophages-like »[50-54].

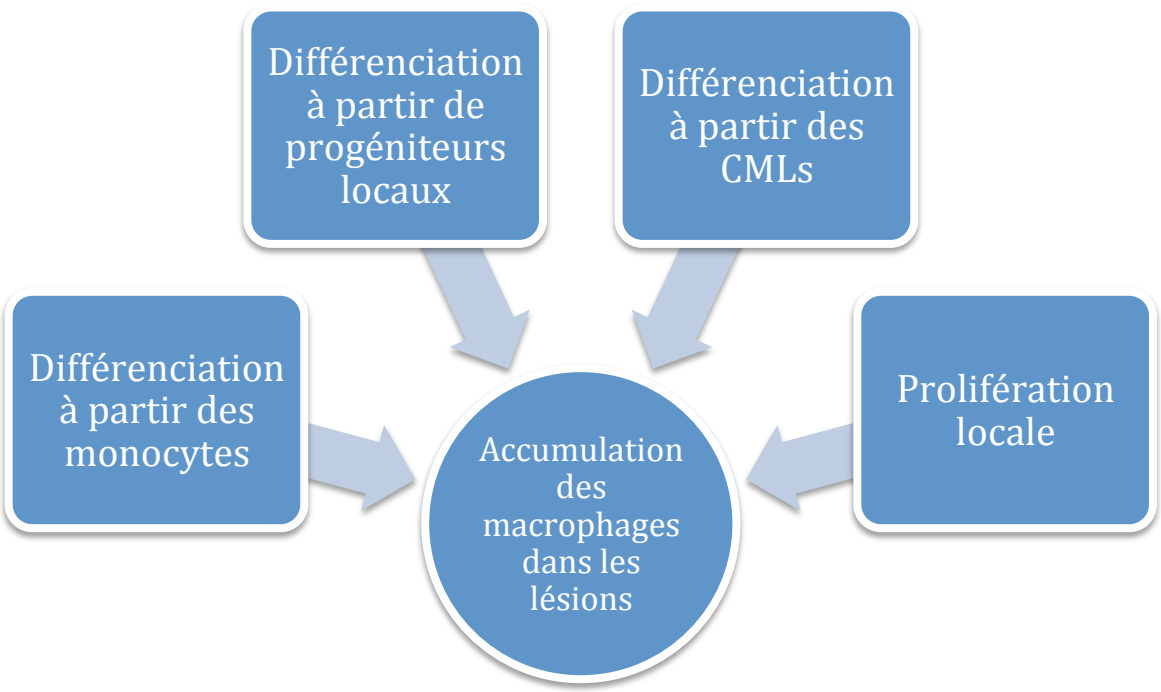


Figure 9 : Origine des macrophages dans les lésions

L'étude de l'origine des macrophages représente donc une étape importante dans la compréhension des mécanismes impliqués dans leur accumulation au sein des lésions.

2.3.4.1.2.2Métabolisme lipidique et formation de cellules spumeuses

L'accumulation de LDLs modifiées dans le sous-endothélium est l'élément déclencheur de l'athérosclérose. Une fois dans l'endosome tardif ou le phagolysosome, la fraction des esters de cholestérol des LDLs sera hydrolysée en FC (Free Cholesterol)[55]. L'excès d'esters de cholestérol sera stocké dans le cytoplasme au niveau de gouttelettes lipidiques. Le métabolisme lipidique résulte d'un équilibre entre l'internalisation de lipide intracellulaire et l'efflux de cholestérol. L'expulsion hors de la cellule du cholestérol en excès est donc une étape importante. Ce phénomène est pris en charge par les deux transporteurs ABCA1 (ATP (Adénosine Triphosphate) -binding cassette, sub-family A, member 1) et ABCG1 (ATP-binding cassette, sub-family G, member 1) qui jouent un rôle important dans la régulation de l'accumulation de lipides intracellulaire. En effet, l'invalidation de ABCA1 et ABCG1 augmente l'inflammation, l'accumulation des cellules spumeuses et la taille des plaques[56, 57].

Les macrophages possèdent une multitude de récepteurs, dont les « Récepteurs Scavengers » (SR) qui participent à l'internalisation des LDL modifiés. Il existe 8 classes de Récepteurs Scavengers , potentiellement impliqués dans le développement de l'athérosclérose[58].

Il a été montré que la déficience en CD36 (totale ou spécifiquement dans les macrophages), qui est un récepteur scavenger, diminue la taille des lésions[59-61]. Cependant une autre étude a montré que la délétion du CD36 dans un modèle de souris $ApoE^{-/-}$ n'influe pas sur l'accumulation de cellules spumeuses malgré une diminution du cholestérol dans les macrophages péritonéaux[62].

Ces résultats suggèrent alors qu'un autre mécanisme peut être activé pour compenser l'absence du CD36.

2.3.4.1.2.3Macrophages et inflammation

Les macrophages lésionnels participent au développement de l'inflammation dans l'athérosclérose via la production de différents facteurs. Parmi ces facteurs on retrouve notamment des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6, IL-18, TNFα)[63-66] ou des chimiokines ayant des propriétés pro-athérogènes comme CCL2 connue comme étant la première à être impliquée dans l'initiation de l'athérosclérose.

Les macrophages possèdent une activité protéolytique importante qui est notamment impliquée dans la stabilité des lésions (voir chapitre « complication et évolution des lésions »).

Il a été mis en évidence que l'internalisation de cristaux de cholestérol par les macrophages murins ou humains, dès les stades précoces, entraine une dysfonction lysosomale induisant la libération de protéases et de ROS dans le cytosol ce qui a pour conséquence l'activation de l'inflammasome NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) et la production d'IL-1β et d'IL-18. La transplantation de souris $LDLr^{-/-}$ avec de la moelle osseuse de souris déficiente en IL-1β diminue la taille des plaques. Des résultats similaires sont observés chez des souris ou de composant de l'inflammasome chez des souris ou $ApoE^{-/-}$ déficientes en NLRP3.

D'autres études ont mis en évidence un rôle majeur de CD36 dans l'activation de l'inflammasome. En effet des macrophages déficients en CD36 et traités avec des OxLDL ne voient pas leur activité lysosomale affectée mais ne peuvent plus produire de l'IL-1β et l'inflammasome n'est pas activé.

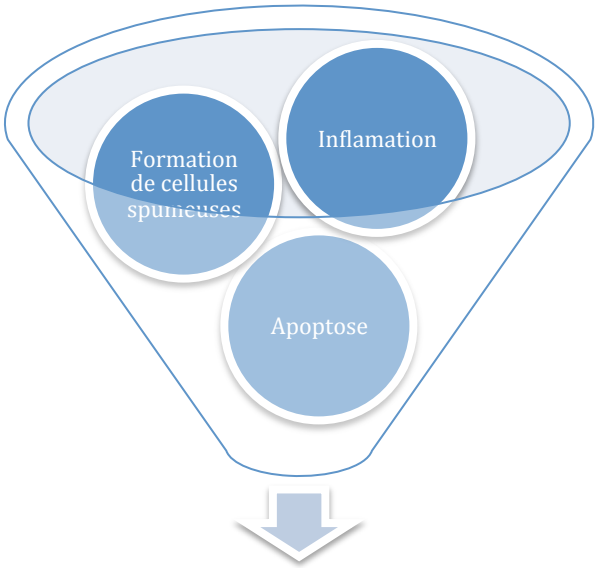


Figure 10 : Rôle des macrophages dans la formation des lésions

2.3.4.1.2.4Plasticité des macrophages dans l'athérosclérose

La plasticité macrophagique a été mise en évidence in vitro au cours d'études expérimentales[67]. Ces études montrent que les macrophages peuvent s'adapter au milieu dans lequel ils se trouvent en adoptant un phénotype fonctionnel différent (Figure 11). A partir de la différenciation de monocytes, on distingue ainsi :

- les macrophages M1 pour « classically activated macrophages »[68]. Ces macrophages sont induits par le LPS ou l'association LPS+IFN☐. ils sont caractérisés par un phénotype pro-inflammatoire et ils sont capables de sécréter des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF☐, l'IL-1☐, l'IL-6, l'IL-12 et l'iNOS. Il a également été décrit que ces macrophages peuvent être induits par une stimulation avec des LDLs ou des OxLDLs.
- les macrophages M2 ou alternatifs[69]. Ces macrophages sont divisés en trois sous-populations : M2a, M2b et M2c. les M2a et M2c ont un profil anti-inflammatoire car ils produisent de l'IL-10 et du TGF☐. Ils sont impliqués dans les phénomènes de réparation tissulaire, de phagocytose de débris cellulaires apoptoses. Les M2b sont particuliers car ils produisent des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1☐, IL-6, and TNF☐[70].

Ces études in vitro témoignent donc de la grande plasticité des macrophages qui est contrôlée par leur environnement local.

Figure 11 : Principaux sous-types de macrophages, et leur voies de différenciation, chez l'homme et la souris (*De Chinetti-Gbaguidi et al. Nat Rev Cardiol 2015*).

Le microenvironnement étant beaucoup plus complexe au sein des lésions. Les études faites in vitro ne reflètent donc pas forcément le comportement des macrophages in vivo (Figure 12).
Les macrophages pro-inflammatoires M1 peuvent être induits directement par les OxLDLs, ou les cytokines pro-inflammatoires.
Les M2 qu'on retrouve au niveau des zones de néo-vascularisation, sont impliqués dans la stabilité des lésions et réduisent la formation des cellules spumeuses.
On retrouve 3 sous-types de macrophages anti-inflammatoires :

- Les M(hb) qui sont induits par l'hémoglobine ou l'haptoglobine et qui se situent au niveau des plaques hémorragiques[71] ;
- Les Mhem qui sont caractérisés par :
    - L'expression de l'heam-oxygenase-1 (HO-1) ;
    - La limitation de l'accumulation des lipides et le niveau de stress oxydatif[72] ;
- Les Mox qui sont un sous-type de macrophages activés par les phospholipides oxydés. Ils sont caractérisés par :
    - Des capacités de chimiotactisme et de phagocytose réduites et peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires ;
    - Chez la souris ils représentent 30% des macrophages totaux[73].
- Au sein des lésions, il existe un équilibre dynamique entre macrophages pro- et anti-inflammatoires, selon le stade et la localisation au niveau de la plaque d'athérosclérose. Une étude a montré qu'au niveau des lésions de stades précoces, les macrophages sont de phénotype M2 alors qu'aux stades avancés, les macrophages switch vers un phénotype M1. Cependant, la différenciation vers un phénotype M4, sous l'effet de la chimiokine CCL4,

semble irréversible[74].

Figure 12 : Principaux phénotypes des macrophages dans les plaques humaines en fonction de leurs facteurs de différenciations (adapté de *De Chinetti-Gbaguidi et al. Nat Rev Cardiol 2015)*

2.3.4.1.3 Les cellules dendritiques

Les DCs (cellules dendritiques) ont été découvertes par Ralph Steinman et Zanvil Cohn dans les années 1970. Les DCs se situent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules agissent comme des sentinelles au niveau des interfaces de l'organisme où elles interviennent dans l'immunosurveillance. Les DCs sont des APC (Antigen-Presenting Cells ou cellules présentatrices d'antigènes professionnelles), elles sont capables de capter un antigène en périphérie (antigène du soi, d'origine microbiennes, ou dérivé de cellules mortes), de migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires où elles présentent cet antigène aux LT (lymphocytes T). Les DCs jouent ainsi un rôle important dans l'initiation et la modulation de la réponse immune.

2.3.4.1.3.1Le développement des DCs

Les DCs représentent une population cellulaire hétérogène dérivant toutes de HSC (Hematopoietic Stem Cells ou cellules souches hématopoïétiques) présentes dans la moelle osseuse[75] (Figure 13).

Schématiquement, chez la souris les DCs dérivent d'un précurseur commun, le MDP (macrophage and DC precursor) au niveau de la moelle osseuse. Le MDP se différencie en CDPs (common DC precursors), responsable de la production de pDCs et de cDCs. La différenciation des pDCs se termine au niveau de la moelle osseuse où ils pourront ensuite migrer à travers le sang pour atteindre les différents tissus. Les cDCs vont se différencier au niveau de la moelle osseuse en pré-DCs qui vont migrer vers les différents organes lymphoïdes et non-lymphoïdes pour se différencier et donner les sous populations CD8$\square^{+}$/CD103^{+} and CD11b^{+}.

De manière analogue aux CDPs, les MDPs peuvent se différencier en cMOP (common monocyte progenitor) pour donner les monocytes[75].

Le FLT3L est indispensable au développement des pDCs et des cDCs alors que le GM-CSF permet la différenciation des DCs à partir de monocytes[76, 77].

Le développement des DCs dépend également de facteurs de transcriptions. Les DC-CD8□$^{+}$ dans les organes lymphoïdes et les DC-CD103^{+} dans les organes non-lymphoïdes, dépendent des facteurs IRF8, Id2 and Batf3, alors que les DC-CD11b^{+} dépendent de RbpJ and IRF4[75].

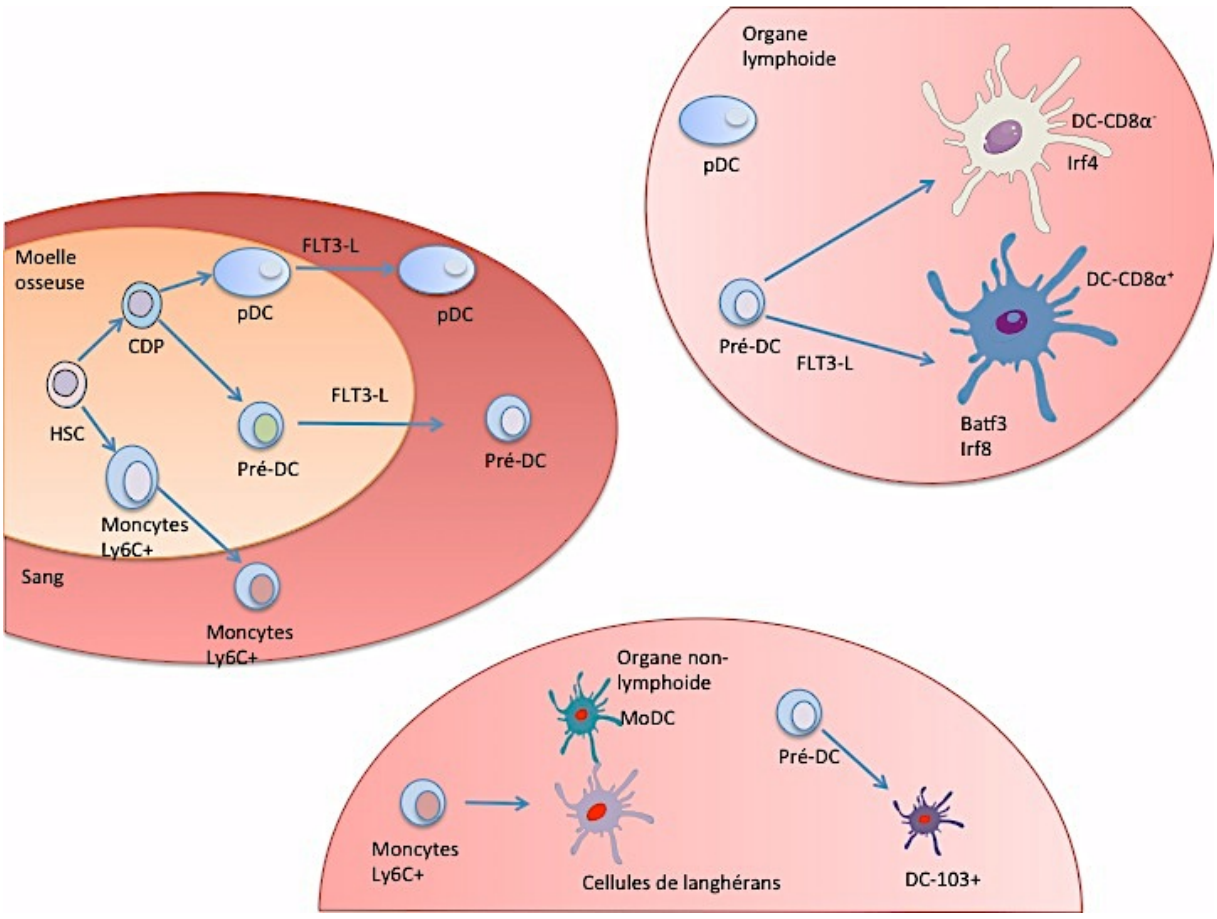


Figure 13 : Ontogenèse des cellules dendritiques

2.3.4.1.3.2Fonctions des cellules dendritiques

Les DCs sont impliquées dans la reconnaissance, la capture et la dégradation des antigènes puis à la présentation de ces derniers aux LTs après avoir migrés vers les organes lymphoïdes secondaires (Figure 14).

2.3.4.1.3.2.1 Reconnaissance des Ag (Antigènes)

On distingue deux grands types d'Ag, les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), issus de pathogènes comme les bactéries et les virus, et les DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) qui sont relargués par des cellules mortes. La reconnaissance de ces Ag par les DCs se fait par l'intermédiaire de récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptor), comme les TLRs par exemple (voir chapitre TLR)[78]. Après avoir reconnu l'Ag, celui-ci va être internalisé par la DC. Ceci va conduire à la maturation et à l'activation de la DC qui se traduit par des modifications phénotypiques et morphologique. En effet, la maturation entraine une réorganisation du cytosquelette et une diminution de sa fonction de phagocytose[79]. Une DC mature est caractérisée par la surexpression de molécules de co-stimulation (CD80/CD86) et d'adhérence, des molécules CMH-I (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I) et CMH-II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II), de chimiokines et de récepteurs de chimiokines comme le CCR7. CCR7 est un récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21 produites dans les zones T des organes lymphoïdes secondaires[79].

2.3.4.1.3.2.2 Présentation des Ag et activation des LT

Les antigènes internalisés par les DCs vont être présentés soit aux LT CD4+ via le CMH-II, soit aux LT CD8+ via le CMH-I (On parle de cross-présentation ou présentation croisée).

L'activation des LT nécessite trois signaux délivrés par les DCs. Le premier signal est la présentation de l'Ag via le CMH au récepteur TCR (T Cell Receptor) du LT, cette liaison est renforcée par les co-récepteurs CD4 ou CD8[80, 81]. Le deuxième signal est l'interaction entre les DCs et les LTs via les molécules de co-stimulation CD80/86 (présentes sur les DCs) et le CD28 (présent sur les LTs)[82]. Le troisième signal est

la production de cytokines par les DCs et qui joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules T effectrices[83].

2.3.4.1.3.2.3 Tolérance

Les DCs jouent également un rôle important dans l'induction de tolérance. On distingue deux types de tolérance, centrale et périphérique. La tolérance centrale, qui a lieu dans le thymus, entraine l'élimination des LT auto-réactifs, reconnaissant des peptides du soi présentés via le CMH par les DCs[84-86]. La tolérance périphérique a lieu dans les tissus où les DCs immatures captent des peptides du soi et les présentent aux LT via le CMH. Les DCs sont alors caractérisées par la faible expression de molécules de co-stimulation, dûe à leur phénotype immature et à l'absence de stimulation de leurs PRR, et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires. Ces DCs entrainent l'anergie (inactivation) des LT naïfs auto-réactifs ou leur différenciation en Treg qui participent également à l'anergie des LT auto-réactifs.[87-89].

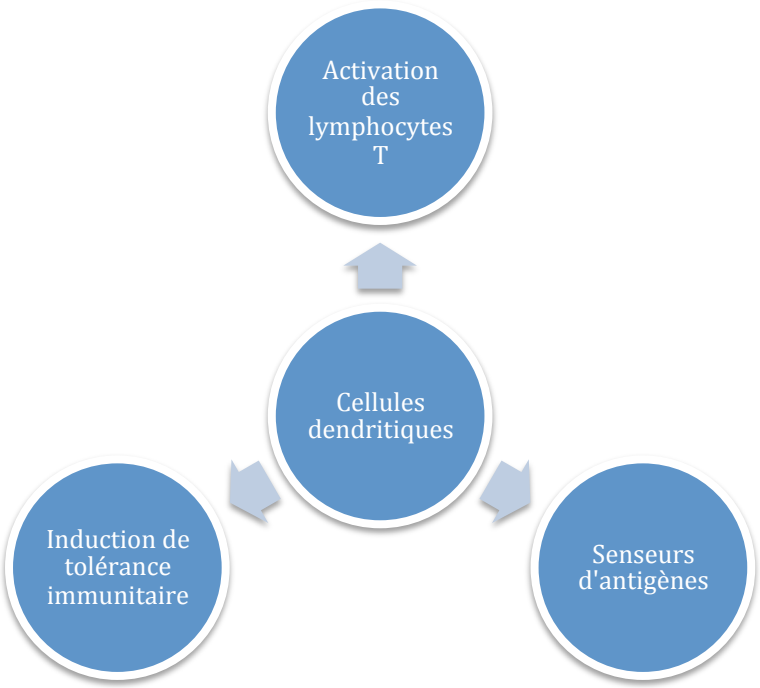


Figure 14 : Fonctions physiologiques des cellules dendritiques

2.3.4.1.3.3Rôle des DCs dans l'athérosclérose

La présence de DCs dans l'aorte a été mise en évidence chez l'homme et chez la souris[90, 91]. Elles sont particulièrement présentes au niveau des régions où se développent les plaques d'athérosclérose comme au niveau des courbures de l'aorte. Différentes études ont permis de mettre en évidence le rôle des DCs dans le développement de l'athérosclérose (Figure 15).

2.3.4.1.3.3.1 DC et métabolisme lipidique

Comme les macrophages, les DCs peuvent également se différencier en cellules spumeuses. Cependant, les mécanismes conduisant à la formation de cellules spumeuses à partir des DCs ne sont pas encore connus. De manière intéressante, la déplétion de DCs vasculaires suite à l'injection de DT (toxine diphtérique) chez des souris CD11c-DTR (Diphtheria Toxin Receptor), conduit à l'accumulation de lipides au niveau des lésions aux stades précoces, et une augmentation de cholestérol plasmatique dans des modèles de souris LDLr-/- et ApoE-/-. A l'inverse, la survie des cellules CD11c+, induite par la surexpression de Bcl2 (qui est un facteur anti-apoptotique) spécifiquement dans ces cellules, montre des effets opposés, on observe une diminution des concentrations en VLDL et en LDL[92]. Ces résultats suggèrent donc un rôle des DCs dans l'homéostasie du cholestérol.

2.3.4.1.3.3.2 DC et activation des LT

Les LTs jouent un rôle important dans l'athérosclérose, or les DCs sont indispensables à l'activation des LTs. Il semble donc évident que les DCs participent au développement des lésions. Il a été montré, à partir de coupes histologiques, la présence de DCs au sein des lésions, dont le nombre augmente aux stades avancés. Au niveau des lésions tardives, les DCs sont caractérisées par un phénotype plus activé (surexpression de CD80/86 et de CMH-II), et sont co-localisées avec les LTs, avec qui elles interagissent. A l'inverse, l'invalidation des molécules de co-stimulation CD80/CD86, importantes pour la maturation des DCs, ou la délétion de CD74

(molécule associée au CMH-II et importante pour la présentation des antigènes aux LTs) entraine une diminution de la taille des lésions[93, 94]. Ces résultats suggèrent que la maturation des DCs et l'activation spécifique des LTs orientent la réponse vers un phénotype pro-athérogène.

2.3.4.1.3.4Rôle des différentes sous-populations de DCs

On distingue différents sous-types de DCs au niveau de l'aorte.

Les DC-CD11b+ représente la majorité des DCs observées au niveau de l'aorte et sont localisées dans l'intima[95]. Elles expriment les marqueurs macrophagiques F4/80 et CX_3CR1 et sont capables d'activer efficacement les LT-CD4+[96, 97].

Les pDCs dépendent également du FLT3-L et expriment les marqueurs PDCA-1 (plasmacytoid DC antigen-1) et Siglec-H (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin H) et plus faiblement le CD11c et le CMH-II. Les pDCs sont principalement localisées au niveau de l'adventice mais peuvent aussi être au niveau des lésions[91, 98, 99].

Les DC-CCL17+ ne sont pas présentent au niveau de l'aorte en conditions non pathologiques mais s'accumulent au niveau de l'intima et de l'adventice au cours du développement de l'athérosclérose[100]. Elles expriment les marqueurs CD11c CD11b et CMH-II mais n'expriment pas le CD115 et le F4/80, les différenciant ainsi des DC-CD11b+ et sont caractérisées par une forte expression de marqueurs d'activation comme le CMH-II, le CD40, le CD80 et le CD86[100].

Les DCs-CD103+, également localisées au niveau de l'intima et sont dépourvues des marqueurs CD11b et CX_3CR1 et dépendent du facteurs FLT3-L, qui est indispensables à leur différenciation, leur prolifération et à leur survie[95, 101].

2.3.4.1.3.4.1 Rôle des pDC

Le rôle des pDCs dans l'athérosclérose a également été étudié, cependant leur rôle demeure controversé.

Deux études chez l'homme ont mis en évidence une diminution des pDCs circulants chez des patients[102, 103], alors que d'autres études montrent que le niveau de pDCs n'est pas modifié ou tend à augmenter avec la progression de la maladie[102, 104-106].

Des études à partir de modèles murins ont également été réalisées. Ces études visent à dépléter, de différentes manières, les pDCs afin d'évaluer leur rôle dans l'athérosclérose. Un premier modèle, visant à dépléter les pDCs chez la souris $LDL^{-/-}$ à l'aide d'un anticorps déplétant, protège contre l'athérosclérose[104] alors que d'autres études faites chez la souris $ApoE^{-/-}$ montrent des effets opposés[105, 107].

Ces différents modèles d'études présentent toutefois certaines limites pouvant expliquer les résultats observés. L'anticorps déplétant utilisé permettant la déplétion des pDCs est un anticorps anti-PDCA-1 (Plasmacitoid Dendritic Cells Antigen-1), celui-ci n'est pas totalement spécifique et entraine aussi une légère déplétion (non significatif) des macrophages aortiques[108]. De plus, PDCA-1 est également exprimé par les cellules endothéliales[109].

Des modèles d'invalidation génétiques ont également été élaborés. Ainsi, la délétion spécifique, chez des souris $LDLr^{-/-}$, de Tcf4/E2-2 (helix-loop-helix Transcription factor (E protein)), indispensable au développement des pDCs, dans les CD11c diminue la taille des lésions soulignant un rôle athérogène des pDCs[110]. A l'inverse, un autre protocole visant à dépléter les pDCs via l'injection de DT à des souris chimères $LDLr^{-/-}$ BDCA2-DTR (Blood Dendritic Cell Antigen 2) montre un effet protecteur des pDCs[111]. Cependant, la même étude faite chez la souris $ApoE^{-/-}$ ne montre aucun effet sur la taille des lésions[112].

Ces observations contradictoires peuvent s'expliquer par différents éléments. Dans le modèle $ApoE^{-/-}$BDCA2-DTR, les auteurs montrent une déplétion des pDCs seulement après une semaine, alors qu'après quatre semaines les pDCs n'expriment plus le récepteur à la DT et ne peuvent donc plus être déplétées. Dans le modèle $LDLr^{-/-}$ BDCA2-DTR, les souris ont été soumises à un régime hyperlipidique de 12 semaines. La déplétion des pDCs n'est pas totale et ne représente que 60%. De plus, une étude a montré que l'expression de BDCA2 diminue lorsque les pDCs sont activées via les

TLR7/9[113], suggérant qu'après 12 semaines de régime hyperlipidique l'état d'activation des pDCs ne permette plus leur déplétion.

2.3.4.1.3.4.2 Rôle des DC-CCL17

Une étude a montré que les DC-CCL17+ au niveau des lésions sont co-localisées avec les LT-CD4+[100]. Dans cette même étude, les auteurs montrent que des souris ApoE$^{-/-}$ déficientes en CCL17 développent moins de plaques par rapport à des souris contrôles ApoE$^{-/-}$ avec une diminution de l'accumulation de LTs au niveau des lésions[100] Les auteurs ont montré que les DCs CCL17+ sont important pour la régulation de l'accumulation des Tregs en favorisant leur apoptose. De plus, le CCL17 interagit avec le CCR4 présent sur les LTs naïfs et inhibe leur différenciation Treg[100].

2.3.4.1.3.4.3 Rôle des DC-CD8□$^{+}$/DC-CD103+

Choi et al. ont étudié le rôle des DC-CD103+ en utilisant un modèle de souris Flt3$^{-/-}$ LDLr$^{-/-}$. Dans cette étude, il a été montré que les souris Flt3$^{-/-}$LDLr$^{-/-}$ développent plus de lésions par rapport aux souris contrôles LDLr$^{-/-}$ associées à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IFN□ et TNF□) et à une diminution du nombre de Treg au niveau de l'aorte[95]. Les auteurs suggèrent que les DC-CD103+ limitent le développement des lésions en favorisant une réponse Treg. Cependant, le FLT3 est exprimé dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes natural killer (NK)[114, 115]. Il a également été montré que la déficience en FLT3 entraine une diminution importante de DC-CD11b+[116]. De plus, différentes études ont montré que la déplétion des DC-CD103+/DC-CD8□$^{+}$ ne modifie pas le maintien des Tregs[117-119].

Récemment, différentes études ont évalué le rôle des DC-CD8□$^{+}$/DC-CD103+ en utilisant un modèle de souris BATF3$^{-/-}$ [117-119]. BATF3 est un facteur de transcription indispensable au développement des DC-CD8□$^{+}$ et des DC-CD103+. Deux études ont montré qu'il n'y a pas de différences de taille des lésions entre des souris LDLr$^{-/-}$BATF3$^{-/-}$ et les contrôles LDLr$^{-/-}$ [117, 118]. Ces résultats suggèrent donc

que les DC-CD8□$^{+}$/DC-CD103+ n'interviennent pas dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, Li et al. ont récemment montré que des souris ApoE$^{-/-}$ BATF3$^{-/-}$ nourries pendant 12 semaines avec un régime gras, développent moins de plaques que des souris contrôles ApoE$^{-/-}$ associées à une diminution du nombre de Th1 dans la rate sans modification du nombre de Tregs ou de Th17[119]. Dans cette étude, les auteurs suggèrent un rôle important des DC-CD8□$^{+}$,via la production d'IL-12, dans la stimulation de la production d'IFN□ par les LT-CD4+[119]. Il a été également montré que cette augmentation de production d'IFN□ entraine une augmentation de la production de CCL5 par les macrophages au niveau des lésions, qui est une chimiokine proathérogène impliquées dans le recrutement de leucocytes au niveau des lésions[119-121].

Figure 16Les résultats contradictoires observés dans ces dernières études peuvent être expliqués par l'utilisation des différents modèles LDLr$^{-/-}$ et ApoE$^{-/-}$.

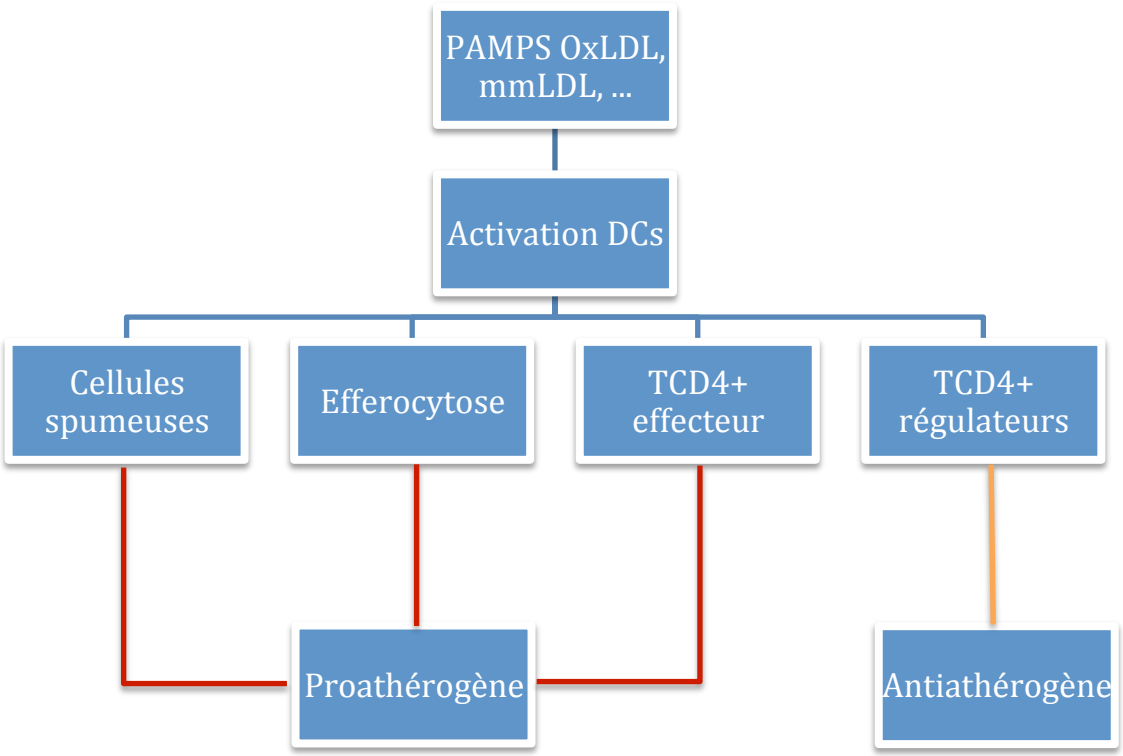


Figure 15 : Rôle des cellules dendritiques dans le développement de l'Athérosclérose

2.3.4.2 *Immunité adaptative*

2.3.4.2.1 Les LT-CD4+

Il existe plusieurs sous types de LTs, caractérisés selon l'expression de leurs protéines de surface et facteurs de transcription, de la signalisation intracellulaire qu'ils induisent, des cytokines qu'ils produisent ou des cellules qu'ils activent. Les LTs les plus largement décrits sont les T-CD4+ et les T-CD8+.

La présence d'une grande proportion de T-CD3+ dans les plaques humaines et murines montrent que ces lymphocytes peuvent jouer un rôle important dans la modulation du développement de l'athérosclérose. Bien que les T-CD8+ ont également été observés dans les plaques, la majorité des LTs, dans les plaques murines, sont les T-CD4+.

Suivant les facteurs présents dans le microenvironnement on distingue plusieurs types de sous-population de LT CD4+ différencié à partir des lymphocytes naïfs Th0 (T helper) : Th1, Th2, Th17 et Tregs. De nombreuses d'études ont mis en évidence un rôle différent de ces sous-populations dans l'athérosclérose ().

2.3.4.2.1.1Th1

Les Th1 produisent de l'IFNγ, TNFα et IL-2 et sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor). La différenciation en Th1 est principalement stimulée par la sécrétion d'IL-12, produite entre autres par les cellules dendritiques, et essentielle pour l'induction de T-bet. Cette sous-population représente la proportion de LT-CD4+ la plus importante. Elle a été essentiellement décrite dans la lutte anti-bactérienne ainsi que dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires.

Le rôle de ces lymphocytes dans l'athérosclérose a été largement décrit. Il s'agit de la sous-population de LTs la plus importante au sein des lésions[122]. L'injection d'IL-12 entraine une augmentation de la production d'IFNγ, cytokine Th1 majeure, au

niveau de l'aorte et une augmentation de la taille des plaques[65]. D'autre part, chez des souris ApoE$^{-/-}$ la déficience d'IL-12 diminue la taille des plaques[123].

L'induction de T-bet est stimulée par l'IL-12 et l'IL-18. Des études ont montré que l'invalidation de l'IL-18 chez des souris ApoE$^{-/-}$ entraine une diminution de l'activation des Th1 associée à une diminution de la taille des lésions[124].

L'injection d'IFNγ à des souris stimule le développement des lésions[125]. De plus, des modèles murins d'invalidation d'IFNγ ou de son récepteur sont caractérisés par une diminution significative de la taille des lésions[30].

2.3.4.2.1.2 Th2

Contrairement aux Th1, le rôle des Th2 dans l'athérosclérose est moins évident. Cette sous-population est caractérisée par l'expression du facteur de transcription GATA-3 qui stimule la production d'IL-4 et d'IL-5 et inhibe la production d'IFNγ. Les Th2 produisent également de l'IL-13, l'IL-33 et de l'IL-10.

Les différentes données de la littérature sur le rôle des Th2 sont contradictoires.

L'IL-4 diminue la production de NO par les cellules endothéliales et stimule la production de radicaux libres avec une expression plus importante de VCAM1[126] et MCP-1 (Monocyte Chimoattractant Protein-1)[127] qui sont des facteurs pro-athérogènes. De plus, cette cytokine favorise l'oxydation des LDLs ainsi que leur phagocytose par les macrophages qui est l'une des étapes clés de l'initiation de l'athérosclérose[128]. D'autre part l'invalidation de l'IL-4 chez des souris ApoE$^{-/-}$ ou des souris chimères LDLr$^{-/-}$ favorise le développement des lésions[129].

Cependant, une autre cytokine Th2, l'IL-5 semble avoir un effet antiathérogène. L'invalidation de l'IL-5 chez des souris LDLr$^{-/-}$ favorise le développement des lésions, suggérant un rôle antiathérogène des Th2. De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-IL-5 augmente la taille des plaques chez des souris ApoE$^{-/-}$. Ce rôle

protecteur de l'IL-5 peut être dû à son effet stimulateur sur les LB1 (Lymphocytes B1) pour produire des IgM (Immunoglobulines M), protecteurs[130].

L'invalidation de l'IL-13 chez des souris chimères entraine une diminution de la production de l'IL-4 et de l'IL-10, une augmentation des d'anticorps IgG induite par Th1 mais sans modification des taux d'IL-5 et d'IFNγ, ceci favorisant l'athérosclérose[131].

L'une des difficultés sur l'étude du rôle des Th2 dans l'athérosclérose réside dans le fait qu'il existe d'autre types cellulaires pouvant exprimer des caractéristiques communes. En effet, GATA-3 est aussi exprimé par les ILC2 et ILC3 (Innate Lymphoid Cells) où il joue un rôle important dans leur différenciation. Tout comme les Th2, les ILC2 peuvent également produire de l'IL-13 et de l'IL-5 mais aussi de l'IL-10, cytokine antiathérogène qui est produite par les macrophages et cellules dendritiques. De plus, certaines études montrent que les ILC semblent jouer un rôle dans l'athérosclérose[132, 133].

2.3.4.2.1.3Th17

Chez la souris, les LTs naïfs se différencient en LTh17, sous l'influence du TGFβ et de l'IL-6[134-136]. La différenciation des Th17 nécessite également l'expression du facteur de transcription RORγt (Retinoid-related Orphan Receptor γt) chez la souris, de ROR-C chez l'homme et la coopération de ROR-α, ainsi que STAT-3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)[137]. L'IL-6 stimule l'activation de STAT-3, qui est un facteur important pour la régulation de RORγt [138]. Les Th17 produisent différentes cytokines: IL-17A (isoforme majeure) ainsi que l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-23[139]. Les Th17 jouent un rôle important dans la réponse antibactérienne et antifongique notamment en activant les neutrophiles mais leur augmentation peut être impliquée dans d'autres pathologies comme les maladies auto-immunes ou inflammatoires[140].

Dans l'athérosclérose, des études ont mis en évidence une infiltration de Th17 et l'expression de l'IL-17 dans les plaques humaines[141-143] et murines[141, 144], témoignant d'un rôle potentiel des Th17 dans l'athérosclérose. Cependant, l'implication des Th17 dans le développement de l'athérosclérose est encore très controversée et les différentes études présentent des résultats contradictoires.

Des études rapportent que la déplétion ou l'invalidation de l'IL-17 (ou de son récepteur) aboutit à un phénotype athéroprotecteur[145-149]. Paradoxalement, d'autres travaux ont mis en évidence que l'IL-17 pouvait ralentir la formation des plaques[141, 149]. Il a été montré que l'IL-17 pouvait présenter des propriétés profibrotiques, en augmentant la production de collagène et en stimulant la formation de la chape fibreuse chez des souris LDLr$^{-/-}$[143]. Chez l'homme, on observe au niveau des lésions une augmentation de l'IL-17 associée à une diminution des macrophages et à une augmentation des CMLs contribuant à un phénotype profibrotique[150]. Ainsi, les Th17 pourraient promouvoir la stabilité des plaques.

2.3.4.2.1.4Tregs

On distingue deux sous-types de Tregs : les nTreg (natural Treg) et les iTreg (induced Treg).

Les nTreg se développent dans le thymus et sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD4 et CD25 et du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3). Les nTreg sont importants pour le maintien de l'homéostasie immunitaire.

Les iTreg sont induits en périphérie après stimulation de LTs naïfs par le TGFβ et l'IL-10. Les iTreg sont subdivisés en deux sous population : les Tr1 qui produisent principalement de l'IL-10 et les Th3 qui produisent majoritairement du TGFβ. L'homéostasie des Treg est régulée par le TGFβ, l'IL-2, les molécules de co-stimulation CTLA4 et le CD28 présents sur les LTs qui peuvent interagir avec CD80/CD86 sur les APC [151].

Le rôle protecteur des Treg dans l'athérosclérose a été clairement établi à travers différentes études. Les plaques humaines sont caractérisées par une diminution de Treg (1%–5% des T cells) contrairement à ce que l'on peut observer dans d'autres pathologies inflammatoires chroniques (≤25% des T Cells)[152]. De plus, on observe chez les patients atteints de maladies coronariennes, une diminution du nombre de Treg ainsi qu'une fonction suppressive altérée[153]. Des observations similaires ont été faites chez la souris ApoE$^{-/-}$[154]. De nombreux modèles murins visant à dépléter les Treg ont été mis au point dans le but d'étudier leur rôle dans l'athérosclérose. L'injection d'anticorps déplétant anti-CD25 entraine une augmentation importante de la taille des plaques. La transplantation de moelle osseuse déficiente pour le CD28 ou CD80/86 à des souris LDLr$^{-/-}$ entraine une augmentation de la taille et de l'instabilité des plaques. Une étude développée au sein du laboratoire a permis de confirmer le rôle protecteur des Treg dans l'athérosclérose. L'injection de splénocytes de souris CD28$^{-/-}$ (déficientes en Treg) à des souris ApoE$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$ (Recombination-activating genes 2 knock out) entraine le développement de plaques par rapport aux souris ayant reçu les des splénocytes de souris CD28$^{+/+}$ [155].

Récemment, une nouvelle catégorie de Treg a été décrite dans le contexte de l'athérosclérose, les Treg CD8+. Cette population semble réguler les interactions entre les Th folliculaires et les cellules B du centre germinal, ce qui orienterait vers un phénotype athéro-protecteur[156].

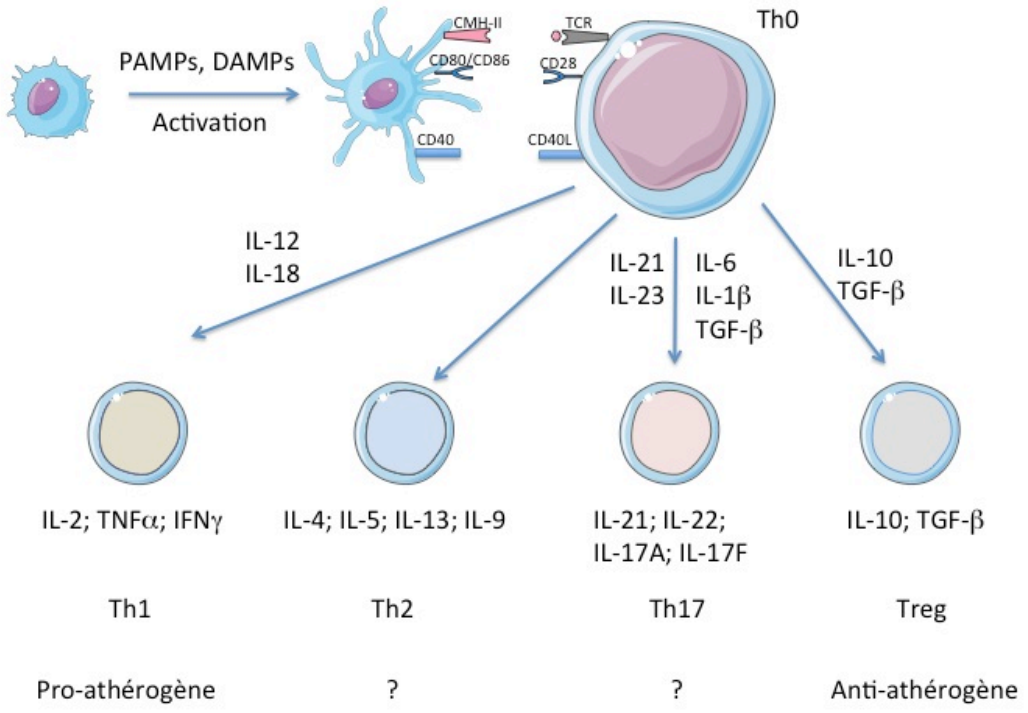


Figure 16 : Rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose

2.3.4.2.2 Les lymphocytes LT-CD8+

Les LT-CD8+ sont impliqués dans la lutte anti-infectieuse en détruisant les cellules infectées. La fonction effectrice des LT-CD8+ est caractérisée par 3 voies distinctes[157-163].

- Les LT-CD8+ peuvent induire l'apoptose des cellules cibles en activant les récepteurs de mort qu'elles possèdent à leur surface.
- La deuxième voie fait intervenir des protéines cytotoxiques contenues dans des granules. La dégranulation des LT-CD8+ entraîne la libération de protéines cytotoxiques, en particulier les perforines et les granzymes (dont le granzyme B). Les perforines facilitent l'entrée du granzyme B, qui va induire la mort de la cellule par apoptose.
- La dernière voie est la production des cytokines pro-inflammatoires TNF□ et IFN□ qui peuvent avoir une action cytotoxique sur les cellules cibles.

Outre ces fonctions effectrices, il existe une sous population de LT-CD8+ aux fonctions immunosuppressives chez l'homme et la souris, les LT-CD8+CD25+ régulateurs[164-168].

L'activation de la réponse des LT-CD8+ est stimulée par les DCs capables de présenter, via leur CMH-I, des antigènes au récepteur des LT-CD8+ (TCR)[169, 170]. Ce mécanisme est appelé « présentation croisée » ou cross presentation (Figure 17).

2.3.4.2.3 Cross-presentation

Contrairement aux molécules de CMH-II qui sont surexprimées en condition inflammatoire, le CMH-I est présent de façon ubiquitaire à la surface de la cellule. Ce mode de présentation fait intervenir deux voies distinctes, une voie cytosolique et une voie endosomale. La voie cytosolique fait intervenir le protéasome qui permet la dégradation des antigènes. Les peptides ainsi formés sont transportés au niveau du RE par les protéines de la famille TAP (Transporter associated with Antigen Processing), ils seront ensuite pris en charge par le CMH-I en vue d'être présentés aux LT-CD8+[171]. La voie endosomale ne fait pas intervenir le protéasome, les antigènes sont internalisés par endocytose, dégradés puis pris en charge par le CMH-I directement dans les endosomes[172-174]. L'activité protéolytique et le pH des endosomes apparaissent comme des facteurs importants et déterminants de la présentation des antigènes aux LTs. En effet, il a été montré qu'une faible dégradation des antigènes par les endosomes, dûe à une faible activité protéolytique induit par un pH neutre, est corrélé à une présentation croisée efficace[175]. A l'inverse, la stimulation de la protéolyse dans l'endosome, activée par un pH acide entraine une plus forte dégradation des antigènes et favorise une présentation des antigènes aux LT-CD4+ via le CMH-II[176]. Le pH de l'endosome régulé par différents facteurs comme NOX2 (NADPH Oxydase 2)[177]. Dans les DCs, NOX2 est présent dans les lysosomes qui peuvent fusionner avec les endosomes sous le contrôle de Rab27, l'invalidation de Rab27 dans les DCs diminue le pH de l'endolysosome, ce qui stimule la protéolyse et diminue l'efficacité de la présentation croisée[178].

Figure 17 : Représentation schématique de la cross-presentation (d'après Joffre et al. Nature Rev Immunology 2012)

2.3.4.2.3.1Rôle des T-CD8+ dans l'athérosclérose

La présence de LT–CD8+ a été mise en évidence au niveau des lésions chez l'homme et chez la souris.

Une étude chez la souris ApoE$^{-/-}$ nourrie pendant 4 semaines avec un régime gras montre une activation des LT–CD8+ plus importante que les LT–CD4+ dans la rate et que ces LT–CD8+ produisent d'importante quantité d'IFNγ et d'IL-10. Ces résultats suggèrent donc que les LT–CD8+ peuvent induire une réponse pro- et anti-inflammatoire.

Des études visant à moduler l'activation des T-CD8+ de façon indirecte ont révélé un rôle pro-athérogène des T-CD8+.

Des souris ApoE$^{-/-}$ traitées avec un agoniste du CD137, (présent au niveau des lésions humaines) ayant des propriétés de co-stimulation des LT–CD8+, présentent une augmentation de l'infiltration en LT-CD8+ au niveau des lésions et une augmentation de la taille des lésions par rapport aux souris contrôles[179]

L'inhibition de PD-1 (Programmed Cell Death-1), qui est un corécepteur impliqué dans l'inhibition de l'activation des T-CD8+, entraine une augmentation de l'infiltration de T-CD8 activés et l'augmentation de la taille des lésions dans un modèle de souris LDLr$^{-/-}$ [180].

D'autres études visant à évaluer de façon directe le rôle des T - CD8+ dans l'athérosclérose ont également été réalisées mais révèlent des résultats contradictoires avec les résultats précédents.

TAP1 (Transporter associated with Antigen Processing 1) est une protéine impliquée dans la présentation d'antigènes par le CMH-I aux LT-CD8+ et joue un rôle important dans le développement des T-CD8+. L'invalidation de TAP1 dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ entraine une diminution considérable du nombre de T-CD8+ dans la

rate et les ganglions lymphatiques. Cependant les souris ApoE$^{-/-}$TAP1$^{-/-}$ et les souris ApoE$^{-/-}$ ne présentent aucune différence de taille de plaque après 8 et 20 semaines de régime gras. Il n'y a également aucune différence d'infiltration de LTs au sein des lésions entre les 2 groupes de souris. Cependant, les souris ApoE$^{-/-}$TAP1$^{-/-}$ sont caractérisées par une augmentation du nombre de LT-CD4+ dans la rate et les ganglions lymphatiques et le sang. Ces résultats suggèrent donc un effet de compensation de la diminution du nombre de LT-CD8+ par une augmentation du nombre de LT-CD4+, qui pourrait expliquer le phénotype observé.

Elhage et al. ont montré qu'il n'y avait aucune différence de taille des lésions entre des souris ApoE$^{-/-}$CD8$^{-/-}$ et ApoE$^{-/-}$ après 18 semaines et 1 an de régime normal. Cependant les temps d'étude sont trop extrêmes et pourraient masquer un éventuel effet des LT-CD8+[181].

Les LT-CD8+ peuvent adopter un phénotype pro-inflammatoire pouvant contribuer au développement de l'athéroclérose. Les LT-CD8+ peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN□, et des médiateurs cytotoxiques comme les perforines et le granzyme B (Figure 18).

Kyaw et al. ont montré que la déplétion de LT-CD8+ avec un anticorps déplétant anti-CD8 entraine une diminution de la taille du centre nécrotique et une diminution de la taille des lésions dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ après 8 semaines de régime gras[182]. Le transfert adoptif de LT-CD8+ entraine une augmentation de l'apoptose, de la taille du centre nécrotique et de la taille des lésions par rapport aux souris contrôles. De manière intéressante, les auteurs montrent que le rôle pro-athérogène des LT-CD8+ est médié par la production des facteurs cytotoxiques perforines et granzyme B mais aussi par la production de TNF□.

Cochain et al. montrent également que la déplétion des T-CD8+ dans un modèle de souris LDLr$^{-/-}$ traitées avec un anticorps déplétant anti-CD8 entraine une diminution de la taille des lésions[183]. De manière intéressante, les auteurs de cette étude montrent également que la déplétion des LT-CD8+ est associée à une diminution du taux de monocytes Ly6C^{hi} dans le sang et une diminution de l'expression de MCP-1/CCL2, une chimiokine connue pour être responsable de l'infiltration de monocytes

au niveau des lésions[35]. Les auteurs montrent également que la production d'IFN☐ par les LT-CD8+ est impliquée dans la production de l'IL-6 par les cellules stromales de la moelle osseuse, qui augmente la myélopeïèse. La neutralisation l'IFN☐ avec un anticorps neutralisant anti-IFNγ induit la rétention des monocytes au niveau de la moelle osseuse[183]. Ces résultats suggèrent donc que les LT-CD8+ via la production d'IFNγ sont impliqués dans la mobilisation des monocytes et secondairement de l'accumulation des macrophages au niveau des lésions.

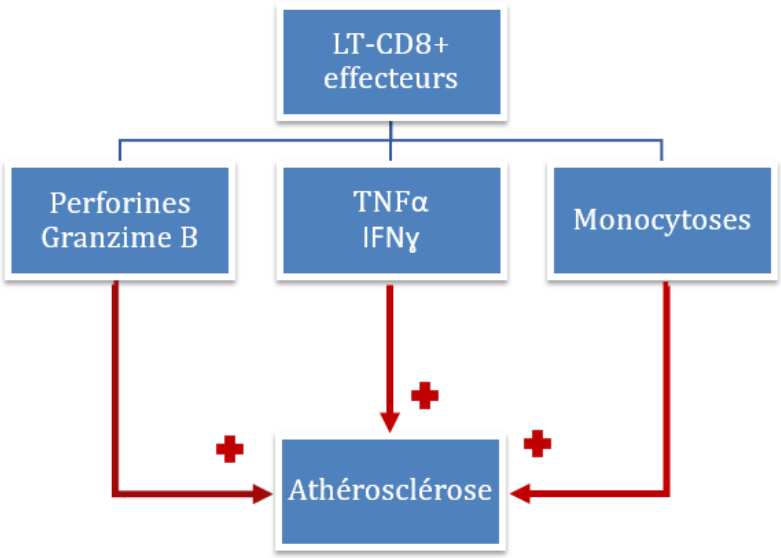


Figure 18 : Rôle pro-athérogène des lymphocytes TCD8

De manière intéressante, différentes études montrent l'existence de population de LT-CD8 dites « régulatrices » ayant des propriétés antiathérogènes (Figure 19) :

Des méthodes d'immunisations visant à injecter le peptide ApoB-100 p210 à des souris ApoE$^{-/-}$ entraine une diminution de la taille des lésions associée à une augmentation d'une population de LT-CD8+ (et possédant les marqueurs CD25+IL-10+) et une diminution des DCs. Le transfert adoptif de LT-CD8+ issus de souris immunisées avec le peptide ApoB-100 p210 à des souris ApoE$^{-/-}$ non immunisées, entraine une diminution de la taille des lésions médiée par la population LT-CD8+CD25+[184].

Zhou et al. ont montré que le transfert de LT-CD8+CD25+ isolées à partir de souris donneuses non immunisées ApoE$^{-/-}$, à des souris receveuses, entraine une diminution

de la prolifération des LT CD4+ et de la taille des lésions par rapport à des souris receveuses ayant reçu des LT-CD8+CD25-. Les auteurs de cette étude ont également caractérisé cette population cellulaire. Ces LT-CD8+CD25+ possèdent le marqueur FOXP3 et peuvent induire la lyse de DCs dérivées de moelle osseuse in vitro[185]. Ces résultats suggèrent alors l'existence d'une population de LT-CD8+CD25+ aux propriétés antiathérogènes. Cependant, des études complémentaires doivent être effectuées afin de déterminer les mécanismes impliqués dans le phénotype antiathérogène observé.

Clement et al. ont mis en évidence le rôle d'une autre population de LT-CD8+ régulateurs dans le développement des plaques d'athérosclérose. Ces LT-CD8+ régulateurs interagissent via leur CMH-Ib avec la molécule Qa-1 présente sur les cellules cibles[156]. Récemment, il a été montré que la liaison du CMH-Ib des LT-CD8+ régulateurs avec le Qa-1 présents sur les Tfh (LT-folliculaires) entraine l'inhibition des Tfh[186]. Dans un modèle de souris D227K, qui présente une mutation au niveau de la molécule Qa-1 empêchant sa liaison au CMH-Ib présent sur les Tregs-CD8+[186], il a été montré que la fonction des Tregs-CD8+ est dérégulée. Dans leur étude Clement et al. ont montré que des souris âgées $ApoE^{-/-}$ ont un taux de LT-CD8+ régulateurs restreint au Qa-1 (Tregs-CD8+/Qa-1) qui est diminué par rapport à des jeunes souris $ApoE^{-/-}$. Les auteurs ont ensuite évalué le rôle des Tregs-CD8+/Qa-1 dans le développement de l'athérosclérose en croisant des souris $ApoE^{-/-}$ âgées avec des souris D227K pour obtenir les souris $ApoE^{-/-}$Qa-1-D227K. L'analyse des lésions des souris $ApoE^{-/-}$Qa-1-D227K révèle une augmentation de l'inflammation associée à une augmentation du taux de Tfh et de LB, et une augmentation de la taille des lésions avec une augmentation d'IgG au niveau des lésions. Afin de limiter la prolifération des Tfh, les auteurs ont traité les souris $ApoE^{-/-}$Qa-1-D227K avec un anticorps neutralisant anti-ICOS pour bloquer le corécepteur ICOS (inductible T cell costimulator), qui est impliqué dans le développement des Tfh. Il en résulte que les souris $ApoE^{-/-}$Qa-1-D227K traitées développent moins d'inflammation et moins de lésions avec une diminution d'IgG au niveau des lésions[156]. Ces résultats suggèrent alors un rôle antiathérogène des Tregs-CD8+/Qa-1 via l'inhibition de l'activation des LB par les Tfh.

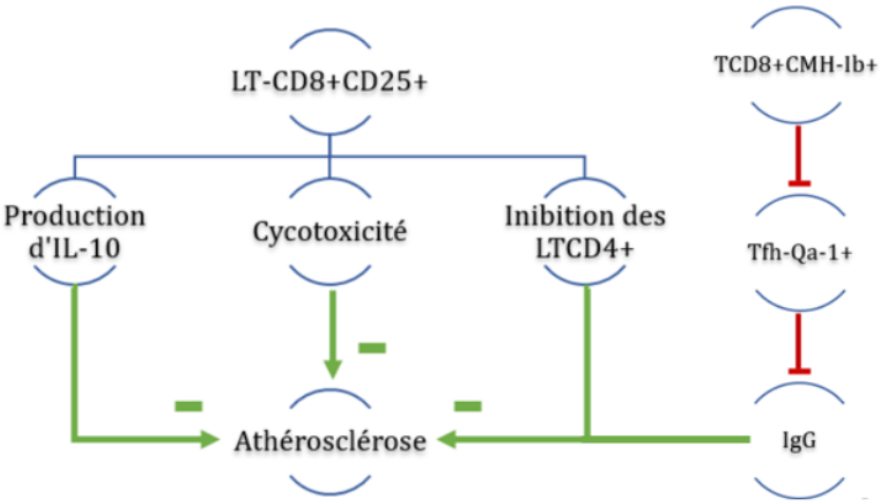


Figure 19 : Rôle antiathérogène des LT-CD8+

2.3.4.2.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B représentent une population hétérogène. On distingue les lymphocytes B1 (B1) et les lymphocytes B2 (B2). Les B1 sont caractérisé par la production d'anticorps IgM sans aucune activation préalable par les lymphocytes T[187]. Les B2 produisent des anticorps IgG, après leur activation via la coopération avec les LTs[188].

Au niveau des lésions la présence de LB est faible. Le rôle des LB dans l'athérosclérose est reflété par la présence importante d'anticorps anti-OxLDL IgM et IgG au niveau des plaques[189]. Ces anticorps forment avec les OxLDLs des complexes immuns.

Il a été montré que la formation de complexes immuns IgM-OxLDL inhibe l'internalisation des OxLDLs par les récepteurs scavengers au niveau des macrophages[190]. De plus, l'invalidation de l'IgM dans un modèle de souris $LDLr^{-/-}$ augmente la taille des lésions, du taux de cristaux de cholestérol et de l'apoptose au niveau des plaques[191]. Chez l'homme, le taux d'anticorps IgM, aussi appelés « anticorps naturel », est associé à une progression moins rapide des lésions[192, 193].

Contrairement aux IgM, les IgG semblent être associés à une progression de la maladie. En effet, la formation de complexes immuns IgG-OxLDL, qui se lient aux Fc□R des monocytes/macrophages, sont associés à une réponse pro-athérogène[194, 195].

Le rôle spécifique des différentes populations de LB a également été étudié.

Les LB sont majoritairement présents au niveau de la rate, et la splénectomie dans un modèle murin diminue considérablement le taux de LB1 et favorise le développement des lésions avec une augmentation de la taille du noyau nécrotique. Le phénotype de ces souris est inversé par le transfert de LB1, où l'on observe une diminution de la taille du cœur nécrotique et des plaques[196].

Ait-Oufella et al. montrent à l'inverse, que la déplétion des LB2 avec un anticorps déplétant anti-CD20, réduit le développement des lésions et est associée à une diminution d'activation des LT-CD4+, du nombre de Th1 et une polarisation de type Th17[197]. Dans cette étude, les auteurs montrent que la population de LB1 au niveau du péritoine est faiblement affectée par la déplétion, et pourrait être responsable du phénotype athéroprotecteur observé. De plus, la déficience en BAFF-R (B-cell activating factor receptor) dans un modèle de souris $LDLr^{-/-}$ ou $ApoE^{-/-}$, caractérisée par une diminution de la population B2, sans affecter les B1, semble être protecteur en limitant l'inflammation et le développement des lésions[198, 199].

Les LB-IRA (Lymphocytes B-Innate Response Activator), une nouvelle sous population de LB découvert récemment, semblent également jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose[200]. Les LB-IRA qui dérivent des L-B1a produisent du GM-CSF et expriment également le récepteur de BAFF (BAFF-R)[201]. Une étude récente a montré que dans un modèle de souris $LDLr^{-/-}$ la délétion spécifique du GM-CSF dans les LB-IRA, après 10 semaines de régime gras, entraine une diminution de la taille des lésions associées à une diminution de l'infiltration en LT-CD4+ et en macrophages[200]. De plus, les auteurs ont également montré une diminution de DCs, une diminution de production d'IFN□ par les Th1 ainsi qu'une diminution d'anticorps IgG2c anti-OxLDL[200].

Comme les LB-IRA sont également affectés par la délétion ou la neutralisation de BAFF-R [201], ils pourraient donc participer au phénotype athéroprotecteur observé en l'absence de BAFF-R dans les modèles cités précédemment.

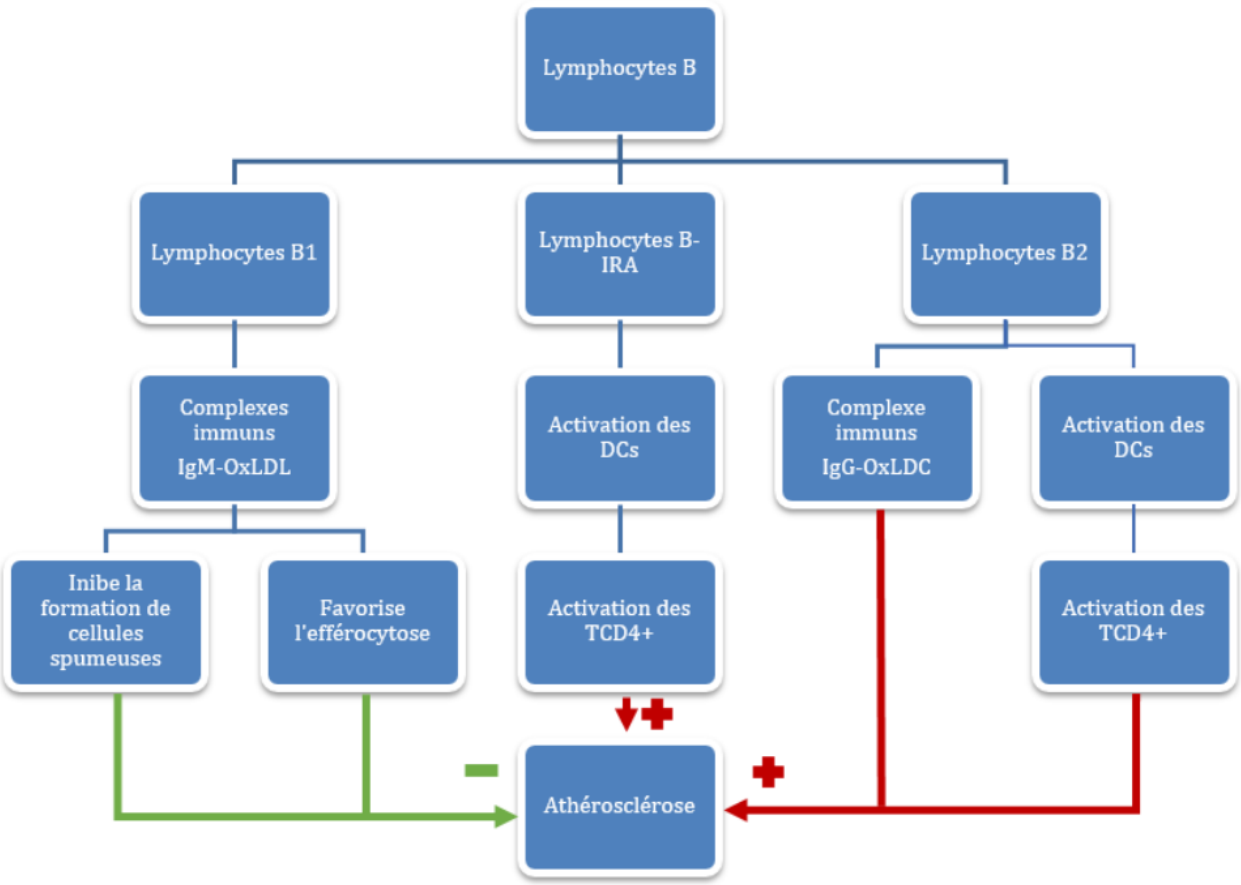


Figure 20 : Rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose

3 MORT CELLULAIRE ET ATHEROSCLEROSE

On distingue trois types majeurs de mort cellulaire : l'**autophagie** l'**apoptose**, et la **nécrose**.

3.1 Autophagie

L'autophagie est le processus par lequel les organites et les autres constituants cellulaires sont séquestrés et dégradés par les lysosomes. Le cytoplasme est activement détruit bien avant que des changements soient observables dans le noyau. Morphologiquement elle se caractérise par la formation de vacuoles au niveau du cytoplasme et la formation de vésicules autophagiques. C'est un mode de résistance au stress, permettant à la fois la survie au cours de carences nutritionnelles et la mort des cellules endommagées ou carencées en facteurs de survie.

3.2 Apoptose

La cellule en apoptose est caractérisée par un rétrécissement cellulaire et une condensation de la chromatine. Le noyau et le cytoplasme se condensent et se fragmentent formant les corps apoptotiques. Les membranes sont conservées, cependant leur structure est réorganisée, elles expriment sur la partie extracellulaire la phosphatidylsérine qui permettra la fixation des phagosomes et l'élimination des corps apoptotiques. L'apoptose, à l'inverse de la nécrose, est une mort cellulaire programmée génétiquement et hautement régulée. Il existe deux voies de régulation, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Figure 21) [202]. L'apoptose peut également évoluer secondairement vers une nécrose.

La voie extrinsèque fait intervenir l'action des récepteurs de mort. Ces récepteurs possèdent un « domaine de mort » dans leur partie intracellulaire, permettant la transmission du signal spécifique. L'activation de ces récepteurs par leur ligand

entraine le recrutement de protéines adaptatrices, telles que FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), au niveau de la membrane. La FADD est une protéine cytoplasmique ubiquitaire contenant également un domaine de mort mais aussi un domaine effecteur de mort (DED) qui va permettre le recrutement de la pro-caspase 8. L'association, au niveau membranaire, du récepteur de mort avec FADD et la pro-caspase 8 forme un complexe multiprotéique appelé DISC (death-inducing signal complex), qui induit un signal d'induction de mort cellulaire [203]. Le complexe DISC active ensuite la pro-caspase 8 en caspase 8 effectrice qui à son tour entraine une cascade d'activation de pro-caspases en caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) aboutissant à l'apoptose de la cellule [204]. DISC peut également activer la caspase 8 de façon indirecte via la protéine Bid (BH3-Interacting-domain Death agonist)[205].

La voie intrinsèque intervient au niveau de la mitochondrie. La dérégulation de certains signaux, comme ceux contrôlant la prolifération cellulaire, conduit à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. La famille de protéines Bcl2 régule cette perméabilisation et entraine la libération des protéines pro-apoptotiques, telles que le cytochrome C, de l'espace inter-membranaire vers le cytosol [206, 207]. Le cytochrome C se fixe ensuite sur le facteur APAF-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) pour former un complexe appelé apoptosome qui va activer les pro-caspases en caspases effectrices (9, 3 et 7) et induire l'apoptose[208].

Figure 21 : représentation des voies majeures de l'apoptose (d'après Hengartner, M. O. et al. Nature 2000)

3.3 Rôle de l'apoptose dans le développement de l'athérosclérose

Il est maintenant établi que la mort cellulaire joue un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose. En effet des études histologiques ont permis de mettre en évidence la présence de corps apoptotiques dès les premiers stades de l'athérosclérose[209]. Les lésions précoces possèdent une faible accumulation en

corps apoptotiques alors que les lésions avancées présentent une accumulation plus importante avec un centre nécrotique. D'autre part, les plaques d'athérosclérose sont caractérisées par la présence de nombreux facteurs susceptibles de stimuler l'apoptose comme l'IFNγ ou le TNFα, et aussi de molécules impliquées dans le stress oxydatif comme les ROS ou le NO (monoxyde d'azote)[210]. Les conséquences de l'apoptose sur le développement des lésions sont différentes selon les cellules touchées. L'apoptose touche tous les types cellulaires dans les plaques, les CMLs, les lymphocytes T, les cellules endothéliales[210]. Cependant, près de la moitié des cellules apoptotiques de la plaque sont des macrophages[210].

L'apoptose des cellules endothéliales joue un rôle important dans le développement des lésions, et plus précisément dans l'érosion des plaques et dans l'athérothrombose. Aux stades précoces, l'apoptose des cellules endothéliales entraine une augmentation de la perméabilité aux LDLs, facteur limitant de la formation de la plaque d'athérosclérose[211]. L'apoptose des cellules endothéliales est particulièrement localisée au niveau des zones où le flux sanguin et les forces de cisaillement sont les plus faibles [212], celle-ci entraine une réorganisation de leurs membranes avec l'exposition de phosphatidylsérines dans la partie externe. Le facteur tissulaire, facteur responsable de la coagulation et de la formation du thrombus, est stimulé par la phosphatidylsérine. De plus, les lésions instables contiennent plus de facteurs tissulaires que les plaques stables[213].

En périphérie du centre nécrotique, les macrophages produisent différents facteurs inflammatoires comme le TNFα et l'IFNγ favorisant l'apoptose des CMLs. Comme pour les macrophages, l'effet de l'apoptose des CMLs dépend du stade d'évolution des lésions. Des modèles animaux ont permis de mettre en évidence que l'apoptose des CMLs aux stades précoces diminue la formation de la néo-intima. Aux stades avancés, les CMLs participent à la formation de la chape fibreuse et sont donc importantes pour la stabilité de la plaque. Ainsi, des études ont montré que l'apoptose des CMLs aux stades tardifs, contribue à une diminution de l'épaisseur de la chape fibreuse, et donc à l'instabilité des lésions[214].

L'étude du rôle de l'apoptose des macrophages à partir de modèles murins met en évidence des résultats qui peuvent sembler contradictoires. Par exemple, des souris $G2a^{-/-}ApoE^{-/-}$ (déficientes pour le récepteur aux lysophospholipides G2a) caractérisées par une diminution de l'apoptose des macrophages et d'une importante infiltration macrophagique, présentent une diminution de la taille des lésions[215]. A l'inverse, l'invalidation de Bcl-2 (B cell lymphoma-2), spécifiquement dans les macrophages, augmente l'apoptose des macrophages ainsi que la taille des lésions[216]. Suivant le stade des lésions, les conséquences de l'apoptose des macrophages différentes. Des études montrent que l'apoptose des macrophages aux stades précoces diminue la taille des lésions alors qu'aux stades avancés, l'apoptose des macrophages augmente la taille des lésions[217-219]. Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les différents rôles des macrophages dans l'évolution des lésions. Aux stades précoces, les macrophages infiltrent massivement les lésions, leur apoptose contribuerait donc à réduire leur nombre macrophage et la réponse inflammatoire[220]. Aux stades tardifs, l'apoptose des macrophages contribue à l'instabilité et au processus thrombotique.

Au cours du développement de l'athérosclérose, les lésions sont caractérisées par une accumulation importante de corps apoptotiques et nécrotiques dû à un défaut d'efférocytose (ou clairance des corps apoptotiques).

3.4 Nécrose & Nécroptose

La nécrose a longtemps été considérée comme un mécanisme de mort accidentelle morphologiquement différent de l'apoptose et de l'autophagie. Elle est caractérisée par l'augmentation du volume cellulaire conduisant à la rupture précoce de la membrane plasmique. Ce processus est accompagné par la dilatation et le démantèlement des organites, en particulier de la mitochondrie. La nécrose est souvent la conséquence de stress physiologiques et de lésions aigues. Néanmoins, il existe un mécanisme de nécrose programmée appelé nécroptose dépendant de la protéine RIPK1 (Receptor Interacting serine-threonine Protein Kinase 1)[221]. L'une des méthodes permettant de caractériser la nécroptose consiste à inhiber la protéine

kinase RIPK1, protéine centrale de ce mécanisme de mort, à l'aide de la nécrostatine-1[222].

Différents mécanismes comme les dommages de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) et les récepteurs de mort peuvent induire la necroptose. De plus, l'inhibition des caspases, par des méthodes pharmacologiques, ou génétiques peut bloquer l'induction d'une mort par apoptose et favoriser celle induite par autophagie ou par nécroptose. Ainsi, un même signal peut produire différents types de mort cellulaire en fonction de l'activation ou de l'inhibition d'enzymes cataboliques dans la cellule, soulignant la relation étroite qui existe entre les différents types de mort cellulaire. C'est le cas par exemple du signal médié par le TNFα qui induit de la nécroptose quand les caspases sont bloquées expérimentalement[223]. Le TNFα se lie à son récepteur et entraîne la formation d'un complexe au sein duquel RIPK1 est polyubiquitinilé par cIAP (cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins) afin de fournir un site de recrutement pour TAK1 (Transforming Growth Factor-β-Activated Kinase 1), TAB2 et TAB3 5 (TAK-Binding protein 1) qui délivrent toutes les deux des signaux de survie cellulaire. Dans le cas où les caspases sont inhibées, Cyld (cylindromatosis) désubiquitinile RIPK1 qui va ainsi se dissocier du complexe et interagir avec son homologue RIPK3 pour former le nécrosome. Ce nouveau complexe active la nécroptose via le recrutement et l'activation par phosphorylation de MLKL (Mixed Lineage Kinase domain-Like protein)[224]. Il existe une autre voie de nécrose régulée liée à des dommages de l'ADN qui induisent l'activation de la molécule PARP1 (Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1). Cette dernière interagit avec le complexe RIPK1 et RIPK3 afin d'activer la nécroptose. A la différence des cellules apoptotiques, qui sont phagocytées intégralement, les cellules nécrotiques/nécroptotiques sont internalisées par macropinocytose ce qui signifie que seule une partie de ces cellules est récupérée par les phagocytes. De même, contrairement à l'apoptose, la nécrose est fortement immunogène à cause du relargage de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-8 et le TNFα.

3.5 Rôle de la nécroptose dans le développement de l'athérosclérose

Le rôle de la nécroptose dans l'athérosclérose n'a été étudié que récemment[225] (Figure 22). L'activité nécroptotique a été observée sur des plaques avancées de carotides humaines à partir de l'analyse des marqueurs RIP3 et MLKL. Les auteurs montrent que ces marqueurs sont surexprimés au niveau des plaques de stade avancé, et que l'expression de RIP3 et MLKL est plus importante au niveau des plaques instables par rapport aux plaques stables[225]. L'activation de la nécroptose a été mise en évidence par l'analyse de pMLKL (phosphorylation de MLKL). Les résultats montrent que pMLKL n'est pas présent au niveau des lésions précoces alors qu'il est surexprimé au niveau des lésions avancées, et qu'il est particulièrement présent près du centre nécrotique. Ces résultats suggèrent alors un rôle de la nécroptose dans la stabilité de la plaque[225].

Les mécanismes impliqués dans l'induction de la nécroptose ont aussi été étudiés. Les auteurs mettent en évidence un rôle majeur des OxLDLs dans l'induction de la nécroptose dans les macrophages mais pas dans les CMLs[225]. Ceci peut être dû aux différents mécanismes mis en jeu dans l'internalisation des OxLDLs. En effet, les OxLDLs peuvent directement stimuler l'expression de RIP3 et MLKL mais aussi la phosphorylation de RIP3, qui reflète l'activation de la nécroptose. Les souris $RIP3^{-/-}$ développent moins de lésions que les souris $RIP3^{+/+}$. Ces résultats montrent donc que la seule activation de RIP3 est suffisante pour stimuler la nécroptose et le développement de l'athérosclérose. Les auteurs montrent également que la production de DAMPs et de ROS par les OxLDLs est aussi impliquée dans l'activation de la nécroptose et que ce mécanisme conduit à l'inhibition de l'efférocytose[225].

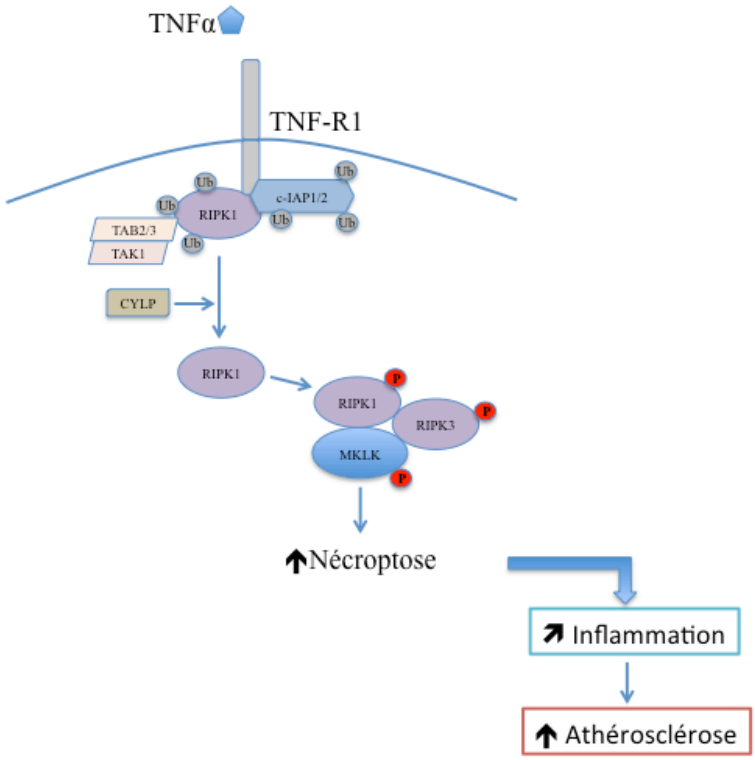


Figure 22 : Signalisation de la nécroptose et rôle dans l'athérosclérose

3.6 Clairance des corps apoptotiques

En situation non pathologique, la présence de corps apoptotique est rarement détectée, dû à leur élimination rapide par phagocytose. La phagocytose ou clairance des corps apoptotiques est appelée efférocytose. Au niveau des lésions d'athérosclérose, les phagocytes ou efférocytes peuvent être d'origine immunitaire comme les macrophages ou les DCs, ou non immunitaire comme les cellules endothéliales, les CMLs ou les fibroblastes. Différents mécanismes sont mis en jeu lors de l'efférocytose : le recrutement des phagocytes, la reconnaissance et l'internalisation des corps apoptotiques, et enfin la réponse induite suite à leur internalisation. Au cours du processus apoptotique, les cellules vont exprimer des signaux « find me » qui vont être reconnus par les phagocytes et permettre leur recrutement. Parmi ces signaux on retrouve notamment la fractaline CX3CL1 et l'ATP (Adénosine Triphosphate) par exemple[226]. En plus de ces signaux, les corps apoptotiques vont exprimer des signaux « eat me » qui vont réguler l'interaction entre le phagocyte et le corps apoptotique en vue de leur internalisation. Le

processus de phagocytose fait intervenir différentes molécules présentes sur les corps apoptotiques et les phagocytes. La phosphatidylsérine des corps apoptotiques peut directement être reconnue par des récepteurs présents sur le phagocyte. D'autres molécules peuvent stabiliser les interactions phagocytes/corps apoptotiques. Ces interactions peuvent également faire intervenir les SR des phagocytes (CD36, SR-A, CD68, LOX) qui vont se lier avec les OxLDLs présents sur la membrane des corps apoptotiques[227].

L'internalisation des corps apoptotiques par endocytose va entrainer leur dégradation après fusion de l'endosome avec un lysosome, et l'activation d'une réponse immune adaptative par les efférocytes (macrophages ou DCs).

3.7 Rôle de l'efférocytose dans le développement de l'athérosclérose

L'efférocytose est un mécanisme tellement rapide et puissant qu'il est quasiment impossible de détecter des corps apoptotiques au niveau de tissu sains, et les rares exceptions où il est possible d'observer des corps apoptotiques au niveau de tissus sains, ces derniers sont souvent proches de phagocytes. Ce qui suggère que ces corps apoptotiques sont reconnus par les phagocytes et que le processus d'efférocytose est déjà déclenché[228], Schrijvers et al. ont mis en évidence une diminution de l'activité de l'efférocytose au niveau des plaques d'athérosclérose (en quantifiant le nombre de corps apoptotiques seuls contre le nombre de corps apoptotiques associés à un phagocytes, macrophages ou autres)[229].

L'origine de ce défaut de clairance des corps apoptotiques n'est pas encore identifié. Différentes hypothèses ont été émises par Thorp et Tabas expliquant ce défaut d'efférocytose : l'apoptose au sein des lésions est trop importante, les capacités d'efférocytose des macrophages des plaques sont diminuées ou encore dû à la diminution des signaux présents sur les cellules apoptotiques stimulant leur phagocytoses[230].

Différents facteurs impliqués dans l'efférocytose et dans le développement de l'athérosclérose ont été découvert (Figure 23). Parmi ces facteurs, on retrouve par exemple MFGE8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8, ou Lactaderin), Mertk (Mertyrosine kinase), Calr/LRP1 (Calreticulin/Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1) et CD47.

MFGE8 est une glycoprotéine sécrétée qui agit comme un pont en fixant la phosphatidylsérine présente sur le corps apoptotiques et l'intégrine $\alpha v\beta 3$ au niveau du phagocyte[231]. Au laboratoire, il a été montré que MFGE8 est exprimé au niveau de plaques humaines mais que son expression est diminuée au niveau de plaques avancées. De plus, des souris $LDLr^{-/-}$ transplantées avec de la moelle osseuse $MFGE8^{-/-}$ présentent une inflammation plus importante que les souris contrôles, ainsi qu'une augmentation de la taille des plaques et un centre nécrotique plus important[232].

Mertk est un récepteur présent à la surface du phagocyte et permet la phagocytose des corps apoptotiques par l'intermédiaire de Gas6 (Growth arrest specific 6)[233]. Une étude au laboratoire a mis en évidence l'expression de Mertk au niveau des macrophages et non au niveau des CMLs pour des plaques humaines. Des souris $LDLr^{-/-}$ transplantées avec de la moelle osseuse déficiente en Mertk développent plus de plaques avec un centre nécrotique plus important, une diminution de l'efférocytose et une augmentation de l'inflammation par rapport aux souris contrôles[234].

Calr/LRP1, qui sont des médiateurs importants de l'efférocytose, et CD47 agissent comme deux axes antagonistes. Calr est présent au niveau des corps apoptotiques et transactive LRP1 qui est présent sur les phagocytes[235-237]. La délétion spécifique de LRP1 dans les macrophages ou dans les CMLs entraine une augmentation importante des plaques d'athérosclérose et de l'inflammation, ainsi qu'un défaut d'efférocytose et une augmentation de la taille du centre nécrotique[238-240].

CD47 est un facteur anti-efférocytique et son expression est rapidement diminuée au cours de l'apoptose. De manière paradoxale CD47 est surexprimé au niveau des

lésions d'athérosclérose[241]. Récemment une étude a mis en évidence un rôle antiathérogène de CD47. La neutralisation de CD47 par un anticorps neutralisant anti-CD47, dans des modèles murins, diminue la progression des lésions et augmente la stabilité des plaques en réduisant la régression du centre nécrotique.[241]

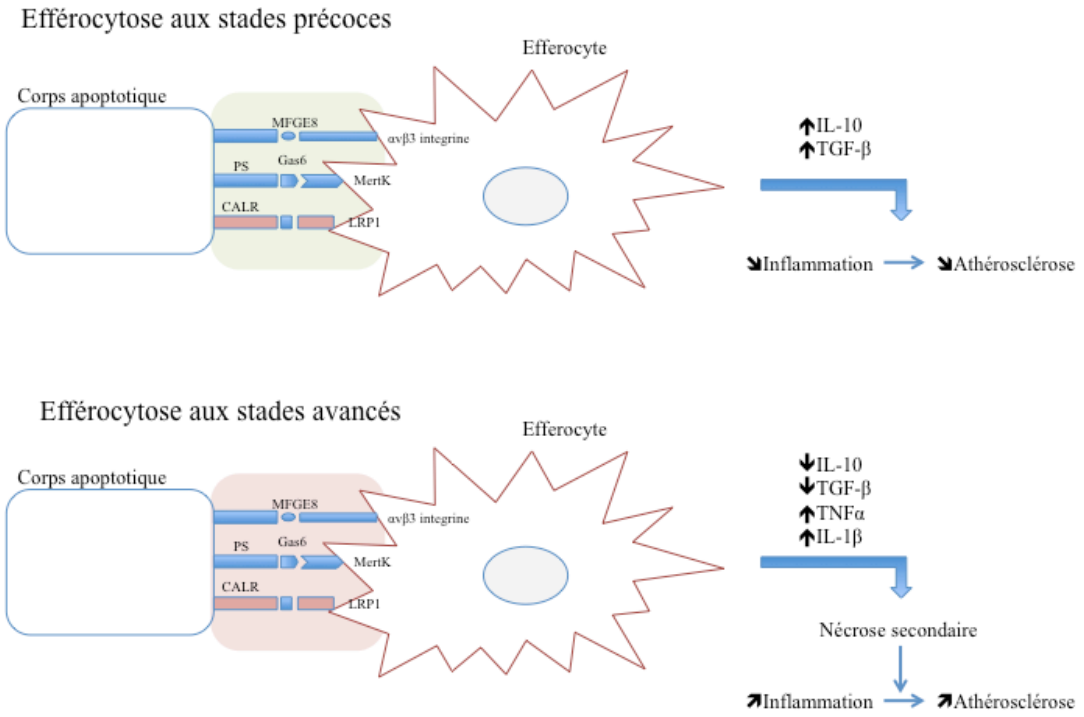


Figure 23 : Efférocytose et athérosclérose

4 LES RECEPTEURS DE « SIGNAUX DANGERS »

La réponse immunitaire innée est la première barrière de défense. Elle nécessite donc de pouvoir reconnaître et agir rapidement contre les « signaux dangers ». Ceci est permis grâce à la présence de récepteurs, appelés PRRs, capables de reconnaître une multitude de motifs présents sur les signaux, de types PAMPs ou DAMPs.

On distingue plusieurs catégories de PRRs : les TLRs, les RLRs (RIG-I Like Receptors), les NLRs (NOD Like Receptor), les CLRs (C-type Lectin Receptor). L'ensemble de ces récepteurs permet ainsi la protection des compartiments aussi bien intracellulaire qu'extracellulaire.

4.1 Les récepteurs de type Tolls (TLRs)

Le gène Toll a été découvert pour la première fois chez la drosophile dont le rôle est essentiel au développement embryonnaire mais aussi dans la lutte antifongique. Ces travaux ont permis par la suite, la découverte de récepteurs aux propriétés similaires chez les mammifères et la compréhension des éléments déclencheurs de l'immunité innée. Les TLRs sont majoritairement exprimés par les cellules de l'immunité innée, plus particulièrement les APCs comme les DCs et macrophages, mais aussi par les cellules de l'immunité adaptatives comme les LBs, ou encore par des cellules non-immunitaire comme les fibroblastes et cellules épithéliales. Les TLRs sont conservés au sein de l'évolution et leur nombre varie d'une espèce à l'autre. Il existe 10 TLRs chez l'humain et 13 chez la souris (le TLR10 correspond à un pseudo-gène chez la souris)[242].

4.1.1 Généralité

Les TLRs appartiennent à la famille des glycoprotéines transmembranaires de type 1. Ils sont composés d'une partie extracellulaire C-terminale qui permet de se lier à son ligand. Ce domaine de liaison possède une séquence qui est riche en LRR (Leucine Rich Repeat), et qui serait potentiellement impliqué dans la reconnaissance de motifs

microbiens (PAMPS) par exemple. Les TLRs possèdent également un segment transmembranaire ainsi qu'un domaine intracellulaire qui est impliqué dans la signalisation induite après la liaison du TLR à son ligand. Ce domaine est caractérisé par la présence d'une séquence appelée Toll /interleukine-l receptor (TIR) qui est conservée et homologue à la région intracellulaire du récepteur de l'IL-1 et de l'IL-18[243].

Chaque TLR reconnaît un motif spécifique via son domaine extracellulaire. Chez la souris, on distingue deux types de TLRs :

- Les TLRs extracellulaires : TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, présents à la surface de la membrane plasmique et jouant un rôle dans la surveillance du compartiment extracellulaire.
- Les TLRs intracellulaires : TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, exprimés au niveau des membranes d'endosomes, et jouant un rôle dans la surveillance du compartiment intracellulaire[243].

Les TLRs sont impliqués dans différents stades de la réponse immune et dans différentes pathologies telles que les pathologies auto-immunes, les maladies dues à des infections virales et bactériennes[242].

4.1.2 Signalisations induites par les TLRs

La liaison du TLR à son ligand entraine la formation de dimères, ainsi que l'activation d'une cascade de signalisation via le domaine intracytoplasmique. Cette signalisation fait intervenir les molécules adaptatrices MYD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) et TRIF (TIR (Toll /Interleukine-l Receptor) domain-containing adaptor protein inducing interferon-β)[244, 245]. A l'exception du TLR3, l'activation des autres TLRs entraine le recrutement de la protéine adaptatrice MYD88 (Figure 24).

4.1.2.1 *Signalisation via MYD88*

L'activation du TLR par la liaison de son ligand entraine le recrutement et la liaison de MYD88 au niveau de sa partie cytoplasmique (Figure 24). Ceci entrainant à son tour le recrutement et la liaison de IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1) et TRAF6 (TNFα receptor associated factor 6). TRAF6 s'ubiquitinyle et permet l'ubiquitinylation de la protéine NEMO (NF-κB (Nuclear Factor-kappa B) Essential Modulator). Ce complexe TRAF6/NEMO, une fois ubiquitinylé, conduit au recrutement et la formation d'un complexe constitué par la famille de protéines TAK1 et de protéines TAB. Ce complexe TAK1/TAB peut activer deux voies distinctes qui sont la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) aboutissant à la stimulation du facteur de transcription AP-1 et à la production de cytokines inflammatoires, ainsi que la voie NF-κB qui régule l'expression de gènes important pour les fonctions de l'immunité et de la prolifération cellulaire par exemple[246].

4.1.2.2 *Signalisation via TRIF*

Cette signalisation est principalement induite par l'activation du TLR3 mais est également stimulée par l'activation de TLR4 (Figure 24).

L'activation du TLR3 ou du TLR4, entraine le recrutement de la protéine TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-β) au niveau de la région intracytoplasmique du TLR. Comme pour MYD88, TRIF va recruter et lier TRAF6 qui va à son tour recruter et fixer TAK1. Cette liaison peut aboutir à la stimulation de la voie NF-κB mais aussi à la stimulation des facteurs de transcription IRF3 et IRF7 et notamment la production d'interféron de type I[247].

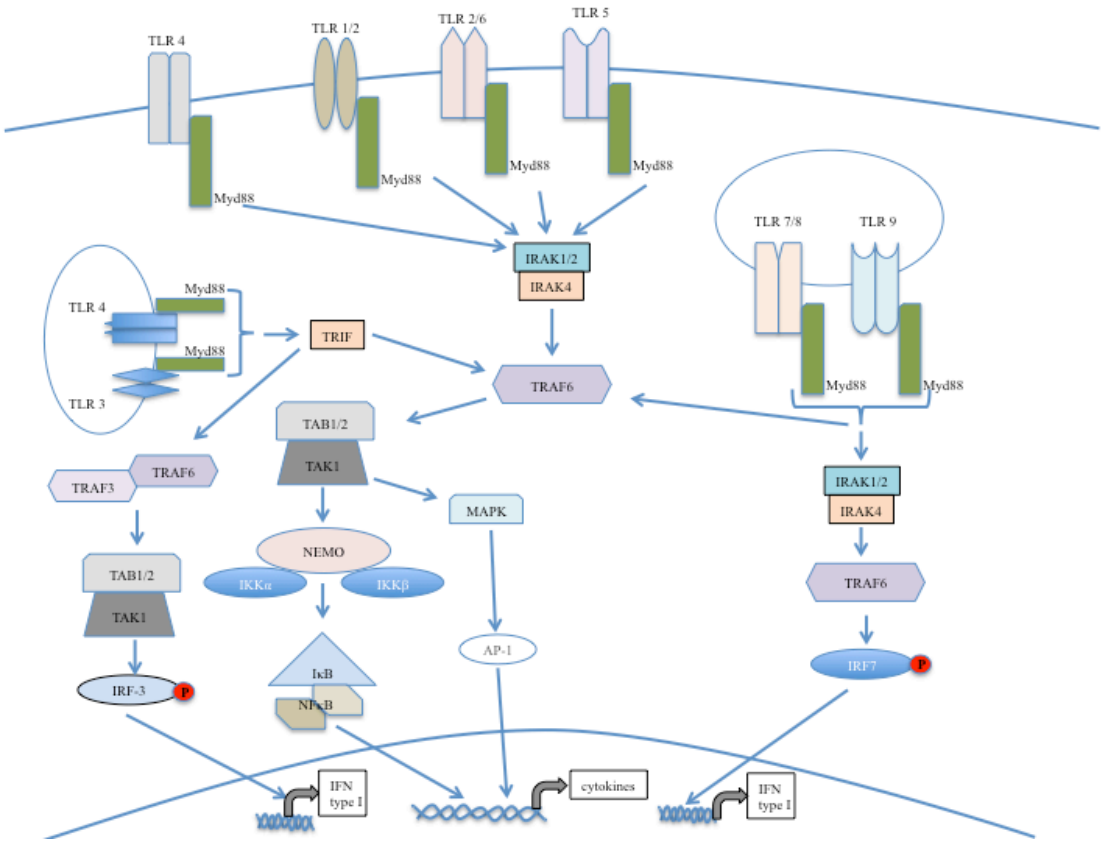


Figure 24 : Signalisation des TLRs

4.1.3 TLRs et athérosclérose

Au sein des plaques d'athérosclérose, les TLRs sont exprimés par différents types cellulaires. Des études ont montré que l'expression des TLR2 et 4 est augmentée au sein des lésions chez l'homme, ainsi que chez les souris $LDL^{-/-}$ et $ApoE^{-/-}$.

Les TLRs peuvent intervenir à différents niveaux dans le développement de l'athérosclérose.

Les TLRs peuvent intervenir dans le recrutement et la réponse inflammatoire au sein des lésions. En effet, l'invalidation de MYD88 chez des souris $ApoE^{-/-}$ entraine une diminution de la taille des lésions associée à une diminution de l'infiltration macrophagique et à une diminution des taux sériques de chimiokines[248, 249]. Des résultats similaires sont observés chez des souris $ApoE^{-/-}$ déficientes en TLR2 et

TLR4[250]. Chez l'Homme, TLR2 et MYD88 interviennent dans l'activation de NFκB et la production de cytokines pro-inflammatoires et de MMPs[251].

Les TLRs peuvent jouer un rôle dans le métabolisme des lipides et la formation de cellules spumeuses. La stimulation des TLR2, 4 et 9 augmente l'expression des SRA et LOX-1 et la formation de cellules spumeuses. Alors que les TLR3 et 4 régulent négativement l'efflux de cholestérol.

Le TLR2 est exprimé sur les cellules immunitaires (comme les macrophages ou les DCs), les cellules épithéliales et les cellules endothéliales[252]. Au niveau des plaques humaines d'athérosclérose, le TLR2 est surexprimé au niveau des cellules endothéliales[253]. De plus, il a été montré, in vitro, que son expression et son activation sont augmentées sous l'effet d'un flux turbulent alors qu'un flux laminaire réduit l'expression et l'activation du TLR2[254]. Des études chez la souris ont montré un rôle pro-athérogène du TLR2. Mullick et al. ont montré que des souris $TLR2^{-/-}$ croisées avec des souris $LDLr^{-/-}$ développent moins de plaques que les souris contrôles après 10 et 14 semaines de régime hyper lipidique, alors qu'il n'y a pas de différence de taille de plaques entre des souris chimères $LDLr^{-/-}$ transplantées avec de la moelle osseuse de souris $TLR2^{-/-}$ et leurs souris chimères contrôles[255]. Une autre étude réalisée par Higashimori et al. montrent une diminution de l'accumulation de cellules spumeuses au niveau des courbures de l'aorte des souris $ApoE^{-/-}TLR2^{-/-}$[256]. Ces résultats soulignent donc un rôle pro-athérogène du TLR2 exprimé par des cellules qui ne dérivent pas de la moelle osseuse et que l'on peut retrouver au niveau des zones de courbure de l'aorte, comme les cellules endothéliales. Le TLR2 peut également interagir avec le TLR1 pour former le complexe TLR1/2[257]. Les auteurs ont également montré que l'injection de Pam3CSK4 (N-palmitoyl-S-dipalmitoylglyceryl Cys-Ser-(Lys)4), qui est un ligand synthétique du complexe TLR1/2, à des souris $LDLr^{-/-}$ augmente de façon significative la taille des lésions. Ce phénotype n'est pas observé après l'injection de Pam3CSK4 en l'absence de TLR2[255, 258]. Le TLR2 est également impliqué dans l'apoptose des macrophages. Le CD36, qui est un récepteur scavengers, limite le

développement du cœur nécrotique observé aux lésions de stades avancés[259]. Le traitement de macrophages péritonéaux avec des OxLDLs entraine leur apoptose via l'activation du CD36 et du stress du RE. Cependant, l'apoptose n'est plus observée avec des macrophages TLR2$^{-/-}$[250]. Le TLR2 peut donc aussi être impliqué dans l'apoptose des macrophages, qui est un facteur important intervenant dans la stabilité des lésions.

Le TLR4 est un récepteur présent au niveau de la membrane plasmique mais aussi dans le compartiment intracellulaire au niveau des membranes endosomales. Il peut aussi bien activer la voie MYD88 que la voie TRIF. Au niveau des lésions humaines, le TLR4 est exprimé par différents types cellulaires à l'image du TLR2, comme les cellules immunitaires (comme les macrophages ou les DCs), ou les cellules non-immunitaires (les cellules épithéliales et les cellules endothéliales)[253]. L'expression du TLR4 est augmentée par les OxLDLs et l'activation du TLR4 est importante pour l'accumulation et l'internalisation de lipides modifiés comme les mmLDLs (minimally oxidized Low-Density Lipoprotein) par les macrophages[260] et leur différenciation en cellules spumeuses[261]. L'efflux de cholestérol médié par les transporteurs ABCA1 et ABGA1, est un mécanisme important impliqué dans la formation de cellules spumeuses. La délétion de ABCA1 et de ABGA1 stimule une réponse pro-inflammatoire via l'augmentation de l'expression du TLR4[57]. Alors que l'activation du TLR4 avec le LPS, inhibe leur expression[262]. Au niveau des CMLs, il a été montré que la production de facteurs pro-inflammatoires induite par les OxLDLs est médiée par le TLR4[263]. Le remodelage de la MEC est également un mécanisme qui peut dépendre du TLR4. En effet, l'activation de la MMP9 (Matrix Metalloprotease-9) est médiée par le TLR4, et entraine la dégradation de la MEC[264]. La fibronectine qui est un composant de la MEC chez l'homme et chez la souris[265, 266], est connu comme un facteur pro-athérogène[267, 268]. Différentes études ont suggéré que le rôle pro-athérogène de la fibronectine peut être médié par le TLR4[269-271]. Le TLR4 peut donc jouer un rôle important dans la stabilité de la plaque, à travers la modulation de la MEC. L'invalidation du TLR4 dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$

diminue l'expression de l'IL-12 et du MCP-1, ceci entrainant une diminution de l'infiltration en macrophages et de la taille des lésions[249].

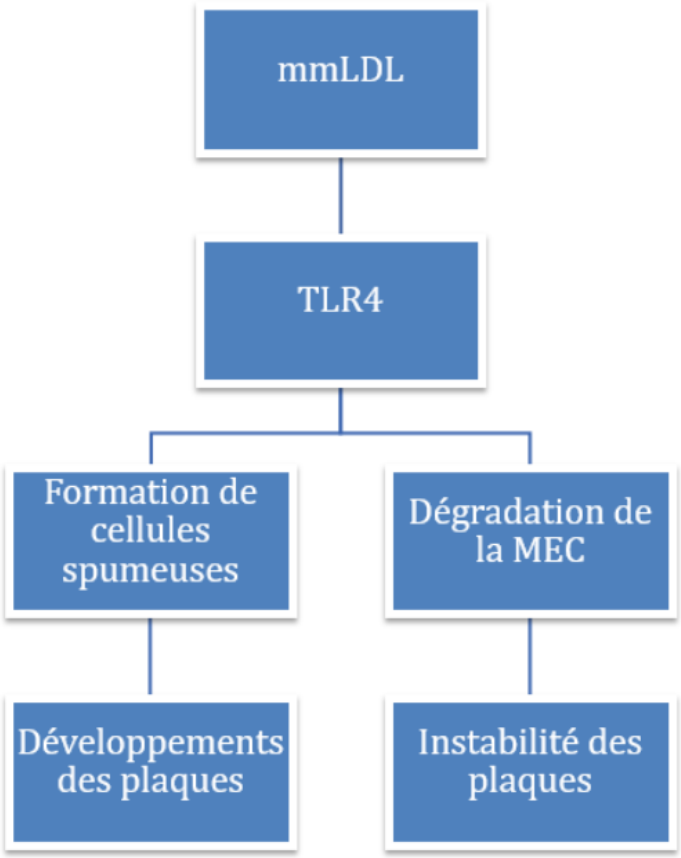


Figure 25 : Rôle du TLR4 dans l'athérosclérose

Les TLR3, TLR7 sont présents au niveau des endosomes et leur implication dans l'athérosclérose a également été étudiée.

L'invalidation de TLR3 dans les modèles ApoE$^{-/-}$ et LDLr$^{-/-}$ entraine une augmentation de la taille des lésions ce qui montre un rôle anti-athérogène du TLR3[272, 273]. La transplantation de moelle osseuse de souris TLR3$^{-/-}$ à des souris LDLr$^{-/-}$ irradiées augmente également la taille des lésions[274] suggérant un rôle important des cellules issues de la moelle osseuse dans le phénotype observé.

Un rôle protecteur du TLR7 a également été démontré. L'invalidation du TLR7 dans un modèle de souris ApoE$^{-/-}$ entraine une augmentation de la taille des lésions associé à une augmentation de l'infiltration et monocytes Ly6C^{hi} et en macrophage. De plus les souris ApoE$^{-/-}$TLR7$^{-/-}$ sont caractérisées par une augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-12, le MCP-1 ou l'IL-6 en comparaison aux souris ApoE$^{-/-}$[275]. Dans cette étude, les auteurs montrent aussi que l'invalidation du TLR7 diminue la composition en CML et en collagène mais également l'épaisseur de la chape fibreuse suggérant une instabilité des plaques plus importante en l'absence de TLR7.

4.2 Les récepteurs de type lectine C

4.2.1 Généralité

Les CLRs font eux aussi parti de la grande famille des PRRs. Les CLRs peuvent être impliqués dans la reconnaissance de dérivés microbiens, de débris cellulaires, de lipides oxydés mais aussi de « signaux dangers » du soi.

Les CLRs représentent une superfamille de récepteurs capables de fixer les sucres (ou hydrates de carbone). Ils sont caractérisés par la présence d'un motif conservé appelé CTLD (C-Type Lectin Domain). L'une des caractéristiques communes aux CLRs, est que la fixation de ces récepteurs aux glucides est dépendante du calcium (Ca^{2+})[276, 277].

La superfamille des CLRs est divisée en deux types: les CLRs de type I possédant plusieurs CRD (Carbohydrate Recognition Domain) et les CLRs de type II qui n'en possèdent qu'un. Les CLRs sont également subdivisés en 17 sous-populations classées selon leur organisation et leur phylogénie. Ils sont présents aussi sous forme soluble ou ancré à la membrane cytoplasmique de différents types cellulaires.

Les CLRs jouent un rôle important dans différents mécanismes cellulaires comme dans l'adhésion, la signalisation cellulaire et la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Ils peuvent également interagir avec d'autres récepteurs afin d'améliorer la réponse à une infection par exemple.

Dans le cadre de ma thèse je me focaliserai sur les CLRs présents au niveau des cellules myéloïdes (Figure 26).

4.2.2 Signalisations induites par les CLRs

Les classes de CLRs dépendent du récepteur, de la signalisation utilisée ainsi que la composition de la partie intra-cytoplasmique du récepteur.

Une partie des CLRs est dite « CLR couplé à la protéine SYK ». Les récepteurs pouvant lier SYK (Spleen tyrosine Kinase) directement possèdent dans leur partie cytoplasmique soit des motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) soit des motifs hemITAMs. Les ITAMs sont caractérisés par la présence de deux séquences YxxI/L (où Y est une tyrosine, x un acide aminé, I une isoleucine et L une leucine) entourant une dizaine d'acides aminés. Les motifs hemITAMs ne possèdent qu'une seule séquence YxxI/L.

Les récepteurs pouvant lier indirectement SYK possèdent une région cytoplasmique couplée à un adaptateur qui est soit DAP12 (DNAX Activating Protein of 12KDa) soit la chaine γ commune aux récepteurs des Ig (FcRγ)[278].

D'autres CLRs possèdent dans leur partie cytoplasmique un motif ITIM (Immunoreceptor Tyosine-based Inhibitory Motif) caractérisé par une séquence V/LxxYxI/V (où Y est une tyrosine, x un acide aminé, I une isoleucine et L une leucine, V une valine). L'activation du récepteur entraine la phosphorylation de ce motif qui induit le recrutement de phosphatase permettant ainsi d'inhiber l'activation des cellules myéloïdes notamment après la stimulation d'un CLR couplé à la protéine SYK ou à la stimulation d'un TLR[278].

Il existe également des CLRs qui sont dépourvus de motifs ITAMs ou ITIMs. Ces derniers sont impliqués dans l'endocytose et la présentation aux lymphocytes T[279]. Cependant, la liaison de ces CLRs avec leur ligand n'entraine pas l'activation des cellules qui les expriment. Leur signalisation n'est pas complètement identifiée[280].

Figure 26 : Famille des récepteurs de type lectine C (adapté de Sousa et al. Annu Rev Immunol. 2012)

4.2.3 Rôle des CLRs dans l'athérosclérose

Le rôle des CLRs a également été étudié dans le cadre de l'athérosclérose. Cependant les travaux ne se limitent qu'à certains récepteurs, Clec4e (C-type lectin domain family 4 member E), également appelé MINCLE (Macrophage Inducible C-type Lectin), Dectin-1 et LOX-1.

4.2.3.1 *Dectin-1*

Chez la souris, dectin-1 est exprimé par les cellules d'origine myéloïde comme les DCs, les monocytes/macrophages, neutrophiles mais aussi par les lymphocytes T $\gamma\delta$. Chez l'homme, dectin-1 est exprimé par les mêmes types cellulaires mais aussi par les éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes B[281-284].

Dectin-1, comme Clec9a (C-type lectin domain family 9 member A), est un récepteur transmembranaire qui possède un domaine hemITAMs dans sa partie cytoplasmique, pouvant recruter directement la protéine SYK[285].

Initialement, il a été montré que le dectin-1 est important pour la défense anti-bactérienne et anti-fongique. Il est notamment activé, indépendamment du Ca^{2+}, par un ligand présent sur certaines bactéries et certains champignons, le β-glucan[286, 287]. Un autre ligand du dectin-1 a été découvert, il s'agit de la vimentine, qui est

une protéine produite par les macrophages associée au cytosquelette et impliquée dans le maintien de l'intégrité de la cellule[288].

L'implication du dectin-1 dans l'athérosclérose n'a été étudiée que récemment[289]. Il a été montré que l'activation de macrophages dans des conditions inflammatoires pouvait produire la vimentine[290] et stimuler la production de ROS connue comme étant un facteur pro-athérogène[288]. De plus, des analyses histologiques ont permis de mettre en évidence la présence de vimentine au niveau des plaques d'athérosclérose humaines et localisée proche du dectin-1[288]. Ces résultats pourraient suggérer alors un rôle pro-athérogène du dectin-1 dans le développement des lésions. Cependant une étude plus récente a montré que dans un modèle de souris chimères, la transplantation de souris $LDLr^{-/-}$ avec de la moelle osseuse de souris $Dectin\text{-}1^{-/-}$ n'entraine pas de modifications de la taille des lésions. ce dernier résultats suggèrerait que le dectin-1 pas dans la modulation de l'athérosclérose[289]

4.2.3.2 *LOX-1*

LOX-1, qui est aussi un récepteur scavenger, est l'un des récepteurs de type lectine C le plus étudié. Il est exprimé par les cellules endothéliales, les macrophages et les CMLs[291]. Son expression est stimulée en conditions pro-inflammatoires par différents facteurs comme le TNFα, l'IFNγ mais aussi par des facteurs vasoconstricteurs comme l'angiotensine II et l'endothéline-1[291].

Différentes études suggèrent que LOX-1 intervient de manière importante dans le développement des lésions d'athérosclérose. Chez l'homme, l'expression de LOX-1 est plus importante dans les plaques aux stades avancés[292]. Au niveau de ces lésions, l'expression de LOX-1 est observée dans différents types cellulaires comme dans les macrophages et les CMLs de l'intima[293].

L'invalidation génétique de LOX-1 dans un modèle de souris chimère $LDLr^{-/-}$ diminue la taille des lésions, à l'inverse la surexpression de LOX-1 accélère le développement des lésions[294, 295].

Le rôle pro-athérogénique de LOX-1 a été étudié plus en détail au niveau des cellules ayant un impact majeur dans l'athérosclérose, les cellules endothéliales (CE), les macrophages, les DCs et les CMLs (Figure 27).

4.2.3.2.1 Rôle de LOX-1 sur les cellules endothéliales

Les CEs sont situées à l'interface entre le sang circulant et la paroi vasculaire, de ce fait elles jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie et dans la tonicité vasculaire.

LOX-1 est majoritairement exprimé par les cellules endothéliales (CEs). Il est également le principal récepteur des OxLDLs sur les CEs. Son rôle proathérogène intervient à différents niveaux notamment sur :

- La dysfonction endothéliale ;
- L'apoptose des CEs ;
- L'activation des CEs ;
- La stimulation de l'inflammation par des CEs.

Il a été montré que les OxLDLs sont impliquées dans la dysfonction endothéliale via la production de ROS[296]. En effet, l'invalidation génétique, ou la neutralisation avec un anticorps spécifique de LOX-1, rétabli la production de NO et diminue la production de ROS. Ces résultats suggèrent donc une implication de LOX-1 dans la dysfonction endothéliale induite par les OxLDLs[297].

Par ailleurs, l'activation de LOX-1 par les OxLDLs stimule l'apoptose des CEs, entrainant une augmentation de la perméabilité vasculaire qui est l'une des premières étapes du développement de l'athérosclérose[298, 299]. D'autre part, la stimulation de l'inflammation dans les CEs par les OxLDLs est également médiée par LOX-1. En effet, l'inhibition de LOX-1, par des ARNs anti-sens, diminue l'expression de chimiokines, telles que le MCP-1, par les CEs qui jouent également un rôle important dans les étapes précoces de l'athérosclérose [300, 301].

4.2.3.2.2 Rôle de LOX-1 sur les macrophages et les cellules dendritiques

De par la grande diversité des SRs exprimés au niveau des macrophages comme le CD36 ou SR-AI, évaluer l'impact spécifique de LOX-1 dans ces cellules est très complexe (Figure 27). A l'état basal, la contribution de LOX-1 dans l'internalisation des OxLDLs est faible et ne représente que 5-10% alors qu'elle peut atteindre jusqu'à 40% en condition pro-inflammatoire après stimulation des macrophages par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα par exemple[302]. De plus, l'activation de LOX-1 par les facteurs inflammatoires diminue l'expression des autres SRs[303]. En conséquence, LOX-1 joue un rôle majeur dans la formation des cellules spumeuses.

Les DCs jouent un rôle important dans la stimulation de la réponse inflammatoire dans l'athérosclérose en activant les LTs. Or, il a été montré que les OxLDLs peuvent stimuler la différenciation des monocytes en DCs et leur maturation[304]. De plus, LOX-1, qui est aussi exprimé par les DCs en condition inflammatoire, favorise l'internalisation des OxLDLs par les DCs[305]. Ces résultats suggèrent que LOX-1 pourrait être impliqué dans l'activation des LTs par les DCs dans l'athérosclérose.

4.2.3.2.3 Rôle de LOX-1 sur les cellules musculaires lisses

Les CMLs jouent un rôle majeur dans la stabilité des lésions. Il a été montré, in vitro, différents stimuli, comme l'angiotensine II ou les OxLDLs, peuvent induire l'expression de LOX-1 par les CMLs, dans des conditions inflammatoires[306, 307]. De plus, l'invalidation génétique de LOX-1 dans des modèles murins diminue la prolifération et la migration des CMLs, qui jouent un rôle important dans la stabilité des plaques[294, 308].

Des analyses immunohistochimiques ont permis de mettre en évidence une colocalisation de LOX-1 avec le facteur pro-apoptotique Bax (Bcl-2-associated X) au niveau des lésions humaines, particulièrement au niveau des zones de rupture. De plus, les OxLDLs augmentent l'expression du facteur pro-apoptotique Bax et diminuent le facteur anti-apoptotique Bcl-2. La modulation de ces facteurs par les

OxLDLs est inhibée lorsque les CMLs sont traitées avec un anticorps anti-LOX-1, suggérant l'implication de LOX-1 dans l'apoptose induite par les OxLDL[309].

LOX-1 est également impliqué dans la transformation des CMLs en cellules spumeuses. En effet, l'expression de LOX-1 est augmentée dans des CMLs traitées avec de la LPC (Lysophosphatidylcholine) (qui est un composant des OxLDLs) ce qui entraine une augmentation de l'internalisation des OxLDLs par les CMLs conduisant à la formation de cellules spumeuses[310].

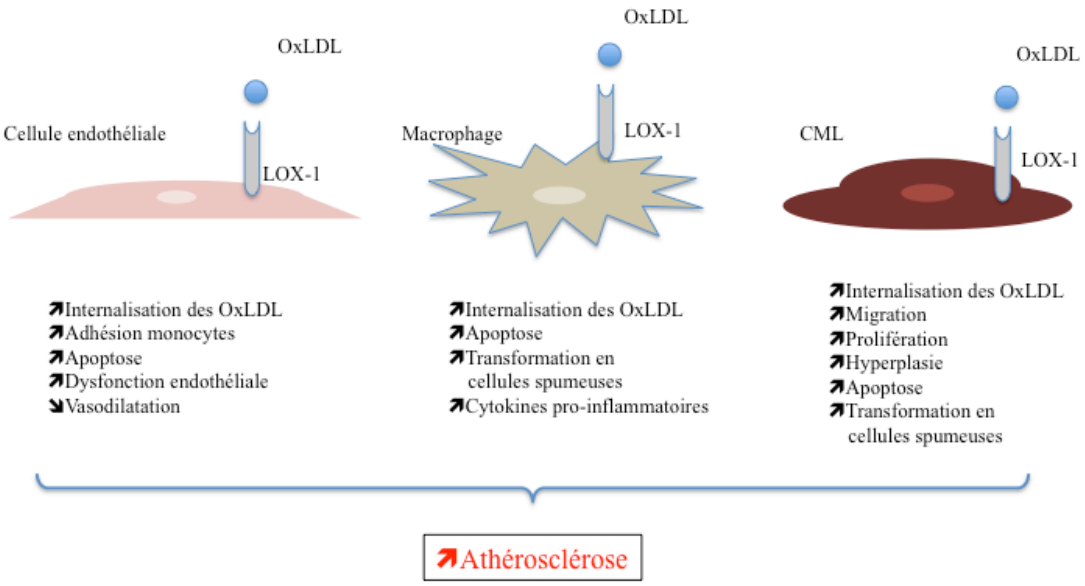


Figure 27 : Rôle de LOX-1 dans l'athérosclérose

4.2.3.3 *MINCLE*

MINCLE est faiblement exprimé par les macrophages et les neutrophiles mais son expression augmente fortement dans les macrophages après stimulation des TLRs ou par des cytokines. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire couplé dans sa partie cytoplasmique avec la chaine FcRγ[311].

Il existe différents types de ligands capables d'activer MINCLE. Ces ligands peuvent être d'origine bactérienne [312-314] ou associés aux corps nécrotiques[311]. Chez

l'homme MINCLE est capable de fixer les cristaux de cholestérol[315]. L'activation de MINCLE stimule par ailleurs la voie SYK/CARD9 (Spleen Tyrosine Kinase/Caspase recruitment domain-containing protein 9) entrainant une réponse pro-inflammatoire[311, 316, 317]. Outre son rôle important dans la lutte anti-microbienne, il a été montré récemment que ce récepteur est aussi impliqué dans le développement de l'athérosclérose. MINCLE est exprimé au niveau des lésions chez la souris[318]. Dans un modèle de souris chimères, la déficience en MINCLE dans les cellules myéloïdes diminue la taille des lésions athéromateuses par rapport aux souris contrôles[318]. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence un rôle important de MINCLE dans l'activation de la réponse au stress du RE, ou réponse UPR (Unfolded Protein Response). En effet, l'activation de MINCLE par le TDB (Trehalose-6, 6'-Dibehenate) stimule l'expression des marqueurs de la réponse UPR comme Chop (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein), Ire1α (Inositol-requiring protein 1 α) et Xbp1 (X-box binding protein 1)[318]. Le rôle de MINCLE dans la régulation de la réponse UPR dans l'athérosclérose intervient à plusieurs niveaux. MINCLE stimule une réponse pro-inflammatoire par les macrophages via la réponse UPR, à l'inverse, la production de facteurs pro-inflammatoires (TNFα et CCL2) après la stimulation de MINCLE par le TDB est inhibée ou réduite lorsque ces macrophages sont invalidés pour Chop ou Ire1α (sans diminution de l'expression de MINCLE)[318]. D'autre part, les souris chimères déficientes en MINCLE sont caractérisées par une diminution de prolifération des macrophages[318]. En effet, le traitement de macrophages avec le TDB diminue l'expression du facteur p21, qui est un inhibiteur du cycle cellulaire, mais stimule l'expression de CSF-1 (Colony stimulating factor 1), qui est un facteur de survie cellulaire ayant des fonctions pro-athérogènes[319]. L'expression de CSF-1 étant dépendante de Ire1α et Chop. Les lésions des souris chimères déficientes en MINCLE semblent également présenter une accumulation en lipides moins importante par rapport aux souris contrôles, suggérant un rôle inhibiteur de MINCLE dans l'efflux du cholestérol par les macrophages[318]. L'expression de ABCA-1, qui joue un rôle majeur dans l'efflux du cholestérol[56], dans les macrophages contrôles est diminuée après traitement avec le TDB dans les macrophages exprimant MINCLE mais pas en l'absence de la

protéine[318]. De plus, in vitro, le TDB inhibe l'élimination du cholestérol dans les cellules spumeuses contrôles mais pas dans les cellules déficientes en MINCLE[318].

Chez l'homme, contrairement au modèle murin, MINCLE peut fixer les cristaux de cholestérol. La liaison de MINCLE à ces cristaux de cholestérol entraine la production de facteurs pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL-1β[315].

4.3 Le récepteur Clec9a

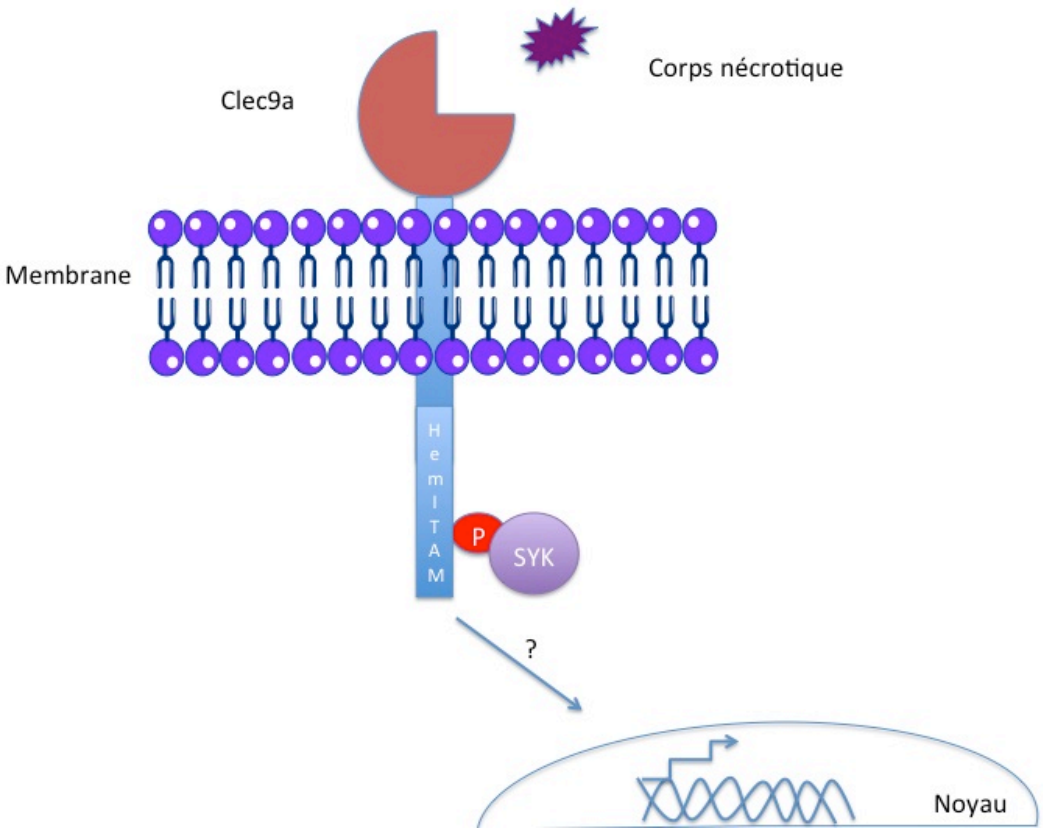


Figure 28 : Structure et signalisation du récepteur clec9a

4.3.1 Généralité

Clec9a, également appelé DNGR-1 (DC, NK-lectin Group Receptor-1) est un récepteur de type lectine C exprimé par les cellules de la lignée myéloïde. Clec9a est un récepteur transmembranaire avec un domaine extracellulaire, un domaine

transmembranaire et une partie intracytoplasmique (Figure 28). Chez la souris, il est majoritairement présent au niveau de la rate sur une sous-population de cellules dendritiques les DC-CD8α^+, plus précisément les DC-CD8α^+CD205$^+$ et les DC-CD8α^+CD205$^-$ (aussi appelées « DC plasmacytoid-like ») ainsi que sur les pré-DCs [320]. Clec9a est exprimé plus faiblement par les pDCs[321]. Au niveau de la moelle osseuse, on trouve une expression de Clec9a sur les CDP[320]. Au niveau des tissus non lymphoïdes, Clec9a est présent sur les cellules dendritiques DC-CD103$^+$CD11b$^-$ qui sont équivalentes aux DC-CD8α^+ de la rate[322]. Chez l'Homme, Clec9a est exprimé par les cellules BDCA3 (Blood Dendritic Cell Antigen 3) du sang, l'équivalent chez l'homme des DC-CD8α^+, et par une sous-population de monocytes CD14$^+$CD16$^-$ [323].

A ce jour, aucun ligand d'origine microbienne n'a été identifié. Clec9a est capable de reconnaître spécifiquement un ligand présent sur les corps nécrotiques mais pas sur les corps apoptotiques. Ce qui suggère que ce ligand n'est exposé seulement après la destruction des membranes. Deux études ont permis d'identifier l'actine F comme le ligand spécifique de Clec9a[324, 325]. L'actine est un élément indispensable à la stabilisation du cytosquelette, et qui existe sous deux formes : une forme globulaire, l'actine G et une forme filamenteuse l'actine F. La polymérisation de l'actine est un processus hautement régulé et fait intervenir des protéines nucléaires qui catalysent la polymérisation alors que les protéines de liaisons stabilisent la structure du complexe.

Dans un premier temps, Zhang et al. et Ahrens et al. ont montré que Clec9a peut fixer directement l'actine F mais pas l'actine G[324, 325]. La polymérisation de l'actine permet l'exposition du ligand de Clec9a[324].

Zhang et al. ont permis de mettre en évidence que la formation d'un complexe constitué d'actine et de protéines de liaison, comme la spectrine et la α-actinine, pourrait permettre de maintenir la conformation de l'actine sous sa forme

filamenteuse (actine F). Ce complexe favorise ainsi la stabilité de la liaison entre Clec9a et l'actine F[325].

4.3.2 Signalisation

La signalisation stimulée par Clec9a est encore mal connue. Le domaine intracytoplasmique de ce récepteur a la particularité d'être constitué de motifs hemITAMs. La liaison de Clec9a à son ligand va induire l'autophosphorylation des motifs hemITAMs, ce qui va déclencher le recrutement de la protéine SYK[321]. Les mécanismes moléculaires impliqués en aval ne sont pas encore identifiés (Figure 28).

4.3.3 Fonction

La fonction principale de Clec9a est de réguler la présentation croisée d'antigènes issus de corps nécrotiques[321]. En effet, Sancho et al. montrent que Clec9a, après la liaison de son ligand, est localisé au niveau de la fraction non-lysosomale. De plus, il a été montré par Zelenay et al. que Clec9a entraine préférentiellement l'internalisation des corps nécrotiques au niveau d'endosomes précoces caractérisés par l'expression des protéines EEA1 (Early Endosomal Antigen 1), Rab5a et Rab11 (Ras-related protein 5a et 11)[326]. Les endosomes précoces sont caractérisés par un pH élevé, limitant ainsi l'activité protéolytique. Ce qui favorise la prise en charge des antigènes par le CMH-I. D'autre part, l'invalidation de Clec9a diminue considérablement la présentation croisée des corps nécrotiques[326-328]. Cependant, Clec9a ne modifie pas la tolérance induite par les corps apoptotiques. Ceci est dû au fait que les corps apoptotiques conservent l'intégrité de leurs membranes, de ce fait le ligand reconnu par Clec9a n'est pas exposé. Il a été également rapporté que la déficience en Clec9a, dans un modèle murin d'infection, inhibe la cross présentation d'antigènes viraux[326, 327]. Ce qui montre que la cross présentation est bien régulée par Clec9a et non pas par l'activation d'autres récepteurs, comme les récepteurs aux PAMPs tels que les TLRs.

4.3.4 Intérêts thérapeutiques de Clec9a

La vaccination visant à délivrer des antigènes via des anticorps spécifiques est un nouveau mode de vaccination pouvant être exploité pour des applications cliniques. Coupler un antigène à un anticorps spécifique peut être ainsi délivré à une population de DCs en ciblant un de ces récepteurs de surface. Idéalement, un bon candidat doit être exprimé de façon spécifique à la surface d'une sous population de DCs par exemple. L'internalisation, via un mécanisme d'endocytose, conduirait à l'activation de la réponse immune. Plusieurs critères permettent de définir Clec9a comme une cible potentielle. Clec9a est principalement exprimé au niveau des DC-CD8α^+ et plus faiblement, et régule spécifiquement la présentation d'antigènes via le CMH-I aux LT-CD8+. De plus, l'activation de Clec9a entraine son endocytose.

Différentes études de vaccinations ont permis d'analyser la réponse induite après avoir délivré des antigènes en ciblant de manière spécifique Clec9a.

Des injections in vivo d'anticorps anti-Clec9a couplés au peptide OVA induit, à l'état basal, une prolifération des réponses T CD4+ et TCD8+ spécifiques, mettant en évidence une présentation du peptide OVA par les molécules du CMH-I et CMH-II[329]. Cibler Clec9a permet donc d'activer des réponses TCD4+ et TCD8+.

Des études de vaccination ont permis de mettre en évidence que Clec9a pouvait induire différentes réponses T-CD4+. En effet, suivant l'adjuvant utilisé, l'injection de souris avec un anticorps anti-Clec9a couplé à un peptide OVA liant spécifiquement la molécule CMH-II stimule une réponse Th1 (lorsque l'adjuvant et le PolyIC, communément connu comme agoniste du TLR3), ou une réponse Th17 (lorsque l'adjuvant utilisé est le curdlane, un polysaccharide d'origine bactérienne et agoniste du CLR Dectin-1)[330]. Au cours de cette même étude, lorsque l'anticorps n'est pas associé à un adjuvant, les auteurs mettent en évidence une réponse T-CD4+FOXP3+, pouvant suggérer l'induction de tolérance immunitaire. Ces résultats peuvent s'expliquer par deux raisons : les DC-CD8□$^+$ représentent une population

de cellules dendritiques contenant une sous-population, les DC-CD8□$^{+}$CD205^{+}, capable de produire de grandes quantités de TGF-□ et d'induire la différenciation des LT-CD4+ en LT-CD4+FOXP3+[331]. La deuxième raison concerne l'environnement, en effet, en condition non-inflammatoire (sans adjuvant), les faibles doses d'anticorps utilisées peuvent induire la différenciation des LT-CD4+ en LT-CD4+FOXP3+ comme cela a été montré dans une autre étude[332].

Cependant, d'autres études viennent contredire ces dernières observations. D'autres chercheurs ont montré que l'injection de souris avec un anticorps IgG2A-anti-Clec9a produit chez le rat et couplé au peptide OVA, stimule une réponse humorale anti-IgG importante et prolongée[333]. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence une prolifération importante de LT-CD4+ dont la majorité d'entre eux co-expriment CXCR5 et PD1 (Programmed cell death 1) qui sont les marqueurs caractéristiques des LTfh (LT-CD4+ folliculaires). Les LTfh étant important pour la réponse humorale induite par les LBs. Résultats également retrouvés avec des études chez les primates non humains[334]. Directement en accord avec ces précédents résultats, il a été montré que cette réponse B était stimulée via l'activation des LTfh.

Ces résultats contradictoires sont principalement dû à l'anticorps anti-Clec9a utilisé. Dans cette étude l'isotype utilisé, l'IgG2A anti-Clec9a, semble être sensiblement plus immunogène que l'isotype IgG1 anti-Clec9a. L'isotype IgG1 doit également être associé au peptide OVA pour pouvoir fixer sa cible. Les deux isotypes ne semblent donc pas cibler le même épitope. Les autres critères pouvant également expliquer ces différences sont l'affinité et la persistance dans le sérum, ceux-ci sont également plus important avec l'anticorps IgG2A-anti-Clec9a.

Une étude a montré que l'utilisation d'un anticorps anti-Clec9a couplé à un adjuvant (anti-CD40, qui est une molécule de co-stimulation, ou le PolyIC, agoniste du TLR3) stimule de manière importante la différenciation de lymphocytes T naïfs en LTc (lymphocytes T cytotoxiques) produisant de l'IFNγ[322]. En effet, dans un modèle murin de tumeurs où les tumeurs sont modifiées pour exprimer le peptide OVA. L'injection d'un anticorps anti-Clec9a couplé au peptide OVA et associé à un adjuvant (anti-CD40), même un mois avant l'injection de tumeur (prophylaxie), entraine

réponse anti-tumorale par l'intermédiaire de LTc spécifiques, la même réponse est observée lorsque la tumeur est injectée avant la vaccination (immunothérapie).

5 RESULTATS

5.1 Rôle de Clec9a dans le développement des lésions d'athérosclérose

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'une délétion totale du récepteur Clec9a sur le développement de l'athérosclérose. Pour cela, nous avons croisé des souris ApoE$^{-/-}$ avec des souris Clec9a$^{-/-}$ pour obtenir des souris double déficiente ApoE$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$. Ces souris, et leurs contrôles ApoE$^{-/-}$, ont été nourries avec un régime normal (Chow Diet, CD) puis sacrifiées à l'âge de 20 semaines. Nous avons observé que la déficience totale de Clec9a entraine une diminution de 60% de la taille des lésions par rapport aux souris contrôles ApoE$^{-/-}$. Le poids des souris et la cholestérolémie n'ont pas été modifiés par l'absence de Clec9a. Dans une autre expérience, les souris ApoE$^{-/-}$ et les souris ApoE$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$ ont été nourries durant 6 semaines avec un régime gras (15% de gras, 1,25% de cholestérol et 0% de cholate). De manière surprenante, nous n'avons pas observé de différence de taille de plaques entre les 2 groupes de souris ayant un taux de cholestérol plasmatique élevé.

Nous avons ensuite évalué l'impact de la déficience de Clec9a dans les cellules de la moelle osseuse en utilisant un modèle de souris chimères. Nous avons irradié des souris LDLr$^{-/-}$ puis 24h après, nous les avons transplantés avec de la moelle osseuse de souris contrôles ou déficiente en Clec9a. Après un mois, les souris ont ensuite été soumises à un régime gras pendant différentes périodes afin d'analyser l'effet de l'absence de Clec9a aux stades précoces (5 et 7 semaines de régime) et aux stades tardifs (13 semaines). Le poids et la cholestérolémie ne sont pas modifiés par l'absence de Clec9a. Nous avons observé une diminution significative de la taille des lésions en l'absence de Clec9a (LDLr$^{-/-}$→Clec9a$^{-/-}$) par rapport aux souris contrôles (LDLr$^{-/-}$→Clec9a$^{+/+}$), au niveau du sinus aortique des souris, après 5 et 7 semaines de régime. Cependant, après 13 semaines de régime, nous n'avons pas observé de différence de taille de plaques entre les 2 groupes de souris.

Les résultats obtenus à partir des modèles ApoE$^{-/-}$ sous régime gras et LDLr$^{-/-}$ sous régime gras pendant 13 semaines, nous ont conduit à émettre l'hypothèse que le taux élevé de cholestérol pourrait être à l'origine de l'absence d'effet de Clec9a dans ces conditions.

L'expression de Clec9a dans la rate des souris a donc été analysée. Il n'y a pas d'expression de Clec9a dans la rate des souris chimères déficientes en Clec9a. Cependant, nous avons observé une diminution significative de l'expression de Clec9a dans la rate des souris après 13 semaines de régime par rapport à des souris LDLr$^{-/-}$ sous régime normal et après 7 semaine de régime gras, nous avons donc émis l'hypothèse que l'hypercholestérolémie pourrait diminuer l'expression de Clec9a. Nous avons testé cette hypothèse in vitro, le traitement de splénocytes de souris Clec9a$^{gfp/gfp}$ (où l'expression de Clec9a est remplacée par l'expression de la GFP) avec du cholestérol diminue l'expression de la GFP.

Nous avons ensuite voulu analyser l'effet de Clec9a dans un modèle de souris développant des lésions de stades avancés mais avec une augmentation modérée du cholestérol plasmatique. Pour ce faire, nous avons généré le modèle Clec9a$^{-/-}$Mfge8$^{-/-}$ en croisant des souris Clec9a$^{-/-}$ avec des souris Mfge8$^{-/-}$ (qui présente un défaut d'efférocytose, et donc une augmentation des plaques)[232]. Nous avons ensuite évalué le développement des lésions d'athérosclérose dans un modèle de souris chimère LDLr$^{-/-}$ après 7 semaine de régime gras. Les souris Mfge8$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$ présentent une augmentation d'apoptose ainsi qu'une augmentation de la taille des plaques, en accord avec des données déjà publiées[232]. Nous avons observé que les souris Clec9a$^{-/-}$Mfge8$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$ dans ce modèle présentent une diminution significative de la taille des lésions par rapport aux souris Mfge8$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$. De plus, les souris Mfge8$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$ développent des lésions de taille équivalente aux souris Clec9a$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$après 13 semaines de régimes gras, ce qui montre que le taux de cholestérol, et non pas la taille des lésions, conditionne les effets de Clec9a.

5.2 Composition cellulaire des lésions

Nous avons évalué l'infiltration lymphocytaire et macrophagique des lésions des souris Clec9a$^{+/+}$→LDLr$^{-/-}$et Clec9a$^{-/-}$→LDLr$^{-/-}$ après 5, 7, et 13 semaines de régime gras.

On a observé une diminution significative de l'infiltration en macrophage au niveau des lésions des souris Clec9a$^{-/-}$→LDLr$^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles après 5, 7 et 13 semaines de régime gras.

L'accumulation de lymphocyte T dans les lésions des souris Clec9a$^{-/-}$→LDLr$^{-/-}$ est moins importante après 7 semaines de régime, cependant cette différence n'est plus observée après 13 semaines de régime.

Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T, et non pas les macrophages, pourraient être impliqués dans le phénotype observé.

5.3 Rôle de Clec9a dans l'inflammation

Nous avons ensuite évalué le rôle de Clec9a sur le profil inflammatoire des souris en analysant, par qPCR, l'expression de différents facteurs pro-athérogènes (IL-6, IFNγ, et IL-1β) et anti-athérogènes (IL-10 et TGF-β) dans la rate des souris Clec9a$^{-/-}$→ LDLr$^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles après 5, 7 et 13 semaine de régime gras. De manière intéressante, on observe une augmentation significative de l'expression de l'IL-10 et du TGF-β, qui sont des cytokines anti-inflammatoires et anti-athérogènes[335, 336], après 5 et 7 semaines de régime, mais pas après 13 semaines de régime. Ces résultats montrent donc un rôle anti-inflammatoire et anti-athérogène de l'absence de Clec9a. De plus, in vitro, des splénocytes stimulés avec du LPS produisent plus d'IL-10 en l'absence de Clec9a, suggérant un effet anti-athérogène médié par la production de l'IL-10 en l'absence de Clec9a.

Nous avons ensuite voulu évaluer le rôle de cette augmentation de l'IL-10 sur le phénotype observé en l'absence de Clec9a. Nous avons croisé des souris Clec9a$^{-/-}$ avec des souris Il-10$^{-/-}$ afin de générer des souris Clec9a$^{-/-}$Il-10$^{-/-}$. A partir du modèle de souris chimère, nous avons évalué la taille des lésions après 7 semaines de régime gras et nous n'avons observé aucune différence de taille des lésions entre les souris LDLr$^{-/-}$ → Clec9a$^{-/-}$ et les souris LDLr$^{-/-}$ → Clec9a$^{-/-}$Il-10$^{-/-}$. Ce qui montre bien que la modulation de la production de l'IL-10 par Clec9a joue un rôle important dans le développement des lésions.

5.4 Rôle de Clec9a dans les DC-CD8α$^+$

Le récepteur Clec9a est majoritairement exprimé par les DC-CD8α$^+$ [321]. Pour évaluer le rôle de Clec9a de manière spécifique dans les DC-CD8α$^+$, nous avons développé un modèle où Clec9a est spécifiquement délété dans les DC-CD8α$^+$. Nous avons irradié et transplanté des souris LDLr$^{-/-}$ avec de la moelle osseuse constituée de 80% de moelle osseuse de souris déplétée en DC-CD8α$^+$ (CD11^{cre+}IRF8$^{flox/flox}$) CD45.2 et 20% de moelle osseuse de souris Clec9a$^{+/+}$ CD45.1 (groupe DC-Cont) ou Clec9a$^{-/-}$ (groupe DC-Clec9a$^{-/-}$) (Figure 29). Cette reconstitution permettant de dépléter les DC-CD8α$^+$ et de reconstituer ces dernières avec de la moelle osseuse de souris Clec9a$^{+/+}$ ou Clec9a$^{-/-}$.

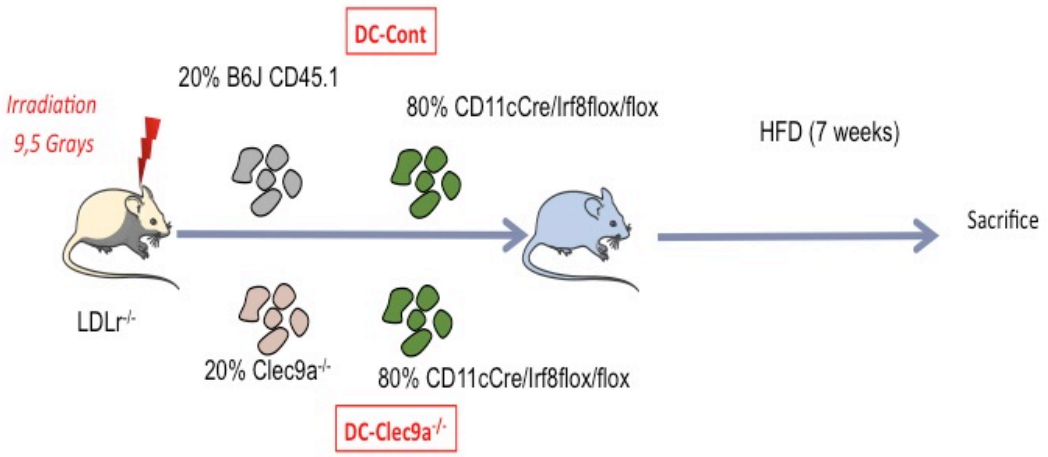


Figure 29 : Protocole de délétion spécifique de Clec9a dans les DC-CD8α$^+$

Le chimérisme a été analysé par cytométrie en flux. Comme attendu, environ 80% des cellules du groupe DC-Cont sont CD45.2, hormis les DC-CD8α^+, et proviennent donc de la moelle osseuse de souris CD11^{cre+}IRF8$^{flox/flox}$ CD45.2. En revanche, 20% des cellules correspondent aux 20% CD45.1. La reconstitution de la population de DC-CD8α^+ est similaire entre les groupes DC-Cont et groupe DC- Clec9a$^{-/-}$. Par qPCR, nous avons observé que Clec9a est très faiblement exprimé dans les DC-CD8α^+ du groupe DC-Clec9a$^{-/-}$ et dans les DC-CD8α^- des 2 groupes alors qu'il est fortement exprimé dans les DC-CD8α^+ du groupe DC-Cont.

L'absence spécifique de Clec9a dans les DC-CD8α^+ diminue l'infiltration des lymphocytes T, sans modification du cholestérol plasmatique total.

De manière intéressante, l'absence de Clec9a dans les DC-CD8α^+ entraine une augmentation significative de l'expression de l'Il-10 au niveau de ces cellules, dans la rate des souris mais aussi au niveau de l'aorte, suggérant un effet local. Cependant, la production d'IL-10 par les DC-CD8α^+ est très faible, suggérant l'implication d'autres types cellulaires. En particulier, il a été montré que la production d'IL-10 DC-CD8α^+ peut entrainer la production d'IL-10 par les T régulateurs Tr1. Ainsi, nous avons montré, in vitro, une production d'IL-10 est plus faible lorsque des LT-CD4+ de souris contrôles sont mis en culture avec des DC-CD8α^+ isolées de souris Il-10$^{-/-}$ par rapport aux DC-CD8α^+ isolées de souris Il-10$^{+/+}$. De plus, la co-culture de LT-CD3+ contrôles avec des DC-CD8α^+ déficientes en Clec9a stimule la production de d'IL-10. Ce qui est en accord avec nos résultats in vivo, où l'absence de Clec9a dans les DC-CD8α^+ est associée à une augmentation de production d'IL-10 par les T-CD4+.

Pour tester le rôle de cette expression de l'Il-10 dans les DC-CD8α^+, en l'absence ou en présence de Clec9a, nous avons irradié et transplanté des souris LDLr$^{-/-}$ avec de la moelle osseuse constituée de 80% de moelle osseuse de souris IRF8$^{-/-}$ et 20% de moelle osseuse de souris Clec9a$^{+/+}$, Clec9a$^{-/-}$, Il-10$^{-/-}$ ou Clec9a$^{-/-}$Il-10$^{-/-}$. Après un mois de reconstitution de moelle, les souris ont ensuite été mises sous régime gras

durant 7 semaines. Nos résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence de taille de plaques en l'absence de Clec9a dans les DC-CD8α^+ lorsque l'IL-10 est délété dans ces cellules par rapport à une délétion de Clec9a seule. De plus, nous avons montré in vitro, que l'augmentation de la production de l'IL-10 par les DC-CD8α^+ en l'absence de Clec9a pourrait probablement se faire via la stimulation du récepteur de l'IL-10 (IL-10r) présent sur les T-CD4+. En effet, la co-culture de DC-CD8α^+ et de T-CD4+, en présence d'un anticorps neutralisant anti-IL-10r (récepteur de l'IL-10), aboli l'augmentation de l'IL-10 en l'absence de Clec9a.

5.1 Article de thèse

Les résultats précédents ont fait l'objet d'une publication ; l'article de thèse est disponible en annexe (8.1 - Article de thèse).

5.2 Rôle de Clec9a dans les macrophages

(Résultats non publiés)

Nous avons également voulu savoir si d'autres types cellulaires pouvaient être impliqués dans la modulation de l'athérosclérose par Clec9a. Deux précédentes études ont suggéré que Clec9a, pourrait être exprimé par les macrophages[337, 338].

Nous avons montré que Clec9a est exprimé par les macrophages. Cependant son expression est relativement faible par rapport au DC-CD8α^+. (Figure 30)

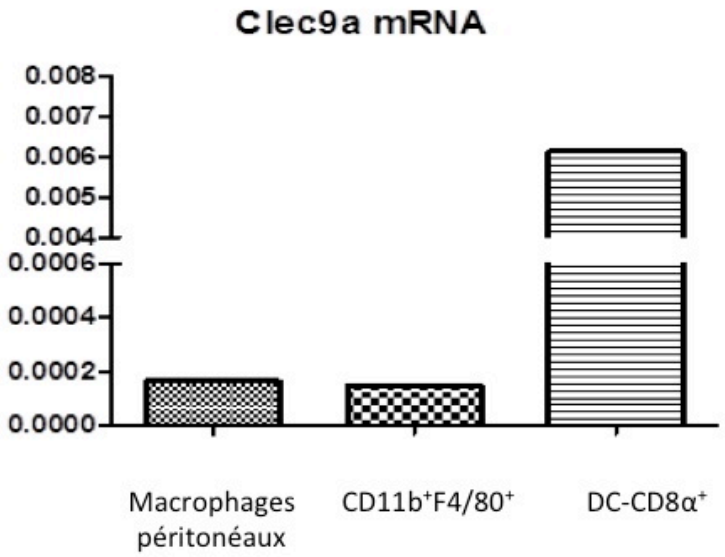


Figure 30 : Comparaison de l'expression de Clec9a dans les macrophage et DC-CD8α$^+$

Nous avons également observé par immunofluorescence, que Clec9a est co-localisé avec les macrophages CD68+ au niveau des plaques de souris ApoE$^{-/-}$ mais pas de souris ApoE$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$, nourries avec un régime gras de 20 semaines (Figure 31).

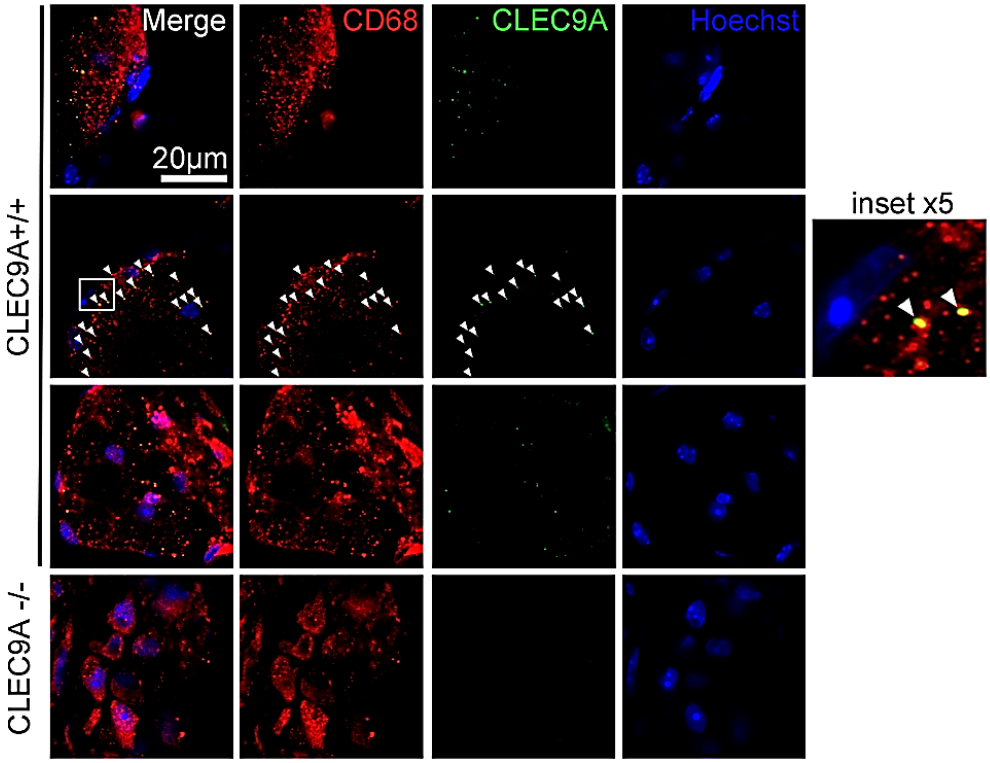


Figure 31 : Expression de Clec9a au niveau des lésions

De manière intéressante, in vitro, les macrophages péritonéaux de souris ApoE$^{-/-}$ Clec9a$^{-/-}$ produisent plus d'IL-10 que les souris contrôles.

Nous avons également évalué la production de l'IL-10 par les macrophages in vivo. Des souris, LDLr$^{-/-}$ irradiées et transplantées avec de la moelle osseuse de souris Clec9a$^{+/+}$ ou Clec9a$^{-/-}$. Après un mois de reconstitution, ces souris ont été nourries pendant 5 semaines avec un régime gras et injectées avec du LPS (2,5mg/kg) 2 fois par semaine, pour augmenter la production d'IL-10 in vivo. Nous avons ensuite analysé la production d'IL-10 et nous avons observé que les macrophages CD11b^{+}F4/80^{+} produisent plus d'IL-10 en l'absence de Clec9a et ceci est associé à une diminution de la taille des lésions (Figure 32).

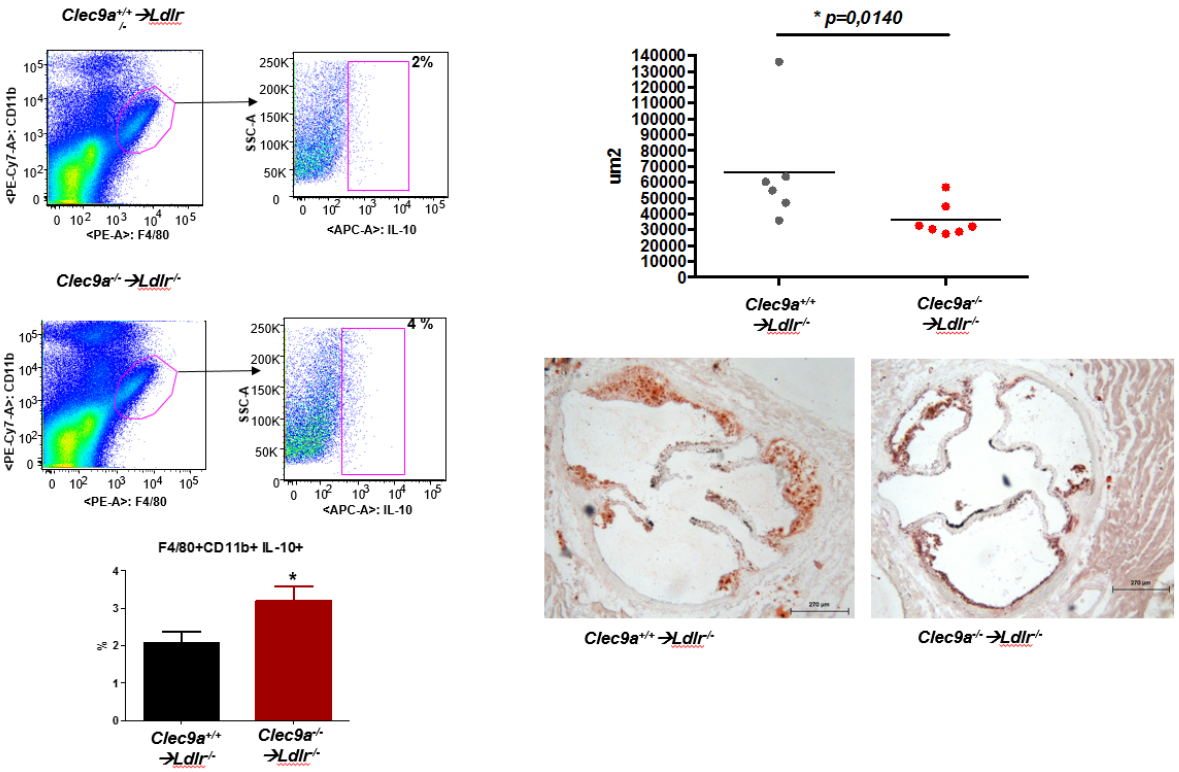


Figure 32 : Evaluation de la production de l'IL-10 par les macrophages et de la taille des lésions in vivo

Les macrophages jouant un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose, nous avons voulu évaluer le rôle de Clec9a spécifiquement dans les macrophages. Pour cela, nous avons utilisé le modèle ApoE$^{-/-}$LyMcre/iDTR, où les monocytes/macrophages peuvent être déplétés par des injections de DT (Diphtheria Toxin).

Nous avons irradié et transplanté des souris ApoE$^{-/-}$ avec un mix de moelle osseuse de souris constitué de 80% de moelle osseuse de souris ApoE$^{-/-}$LyMcre/iDTR (CD45.2 et 20% de moelle osseuse de souris ApoE$^{-/-}$(CD45.1) qui constitue le groupe contrôle Mac-cont ou 20% de moelle osseuse de souris ApoE$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$ qui constitue le groupe Mac-Clec9a$^{-/-}$. Après une semaine de reconstitution, les souris ont été injectées avec de la DT, 3 fois par semaine jusqu'au sacrifice. 4 semaines après la transplantation, les souris ont été mises sous régime gras durant 3 semaines (Figure 33).

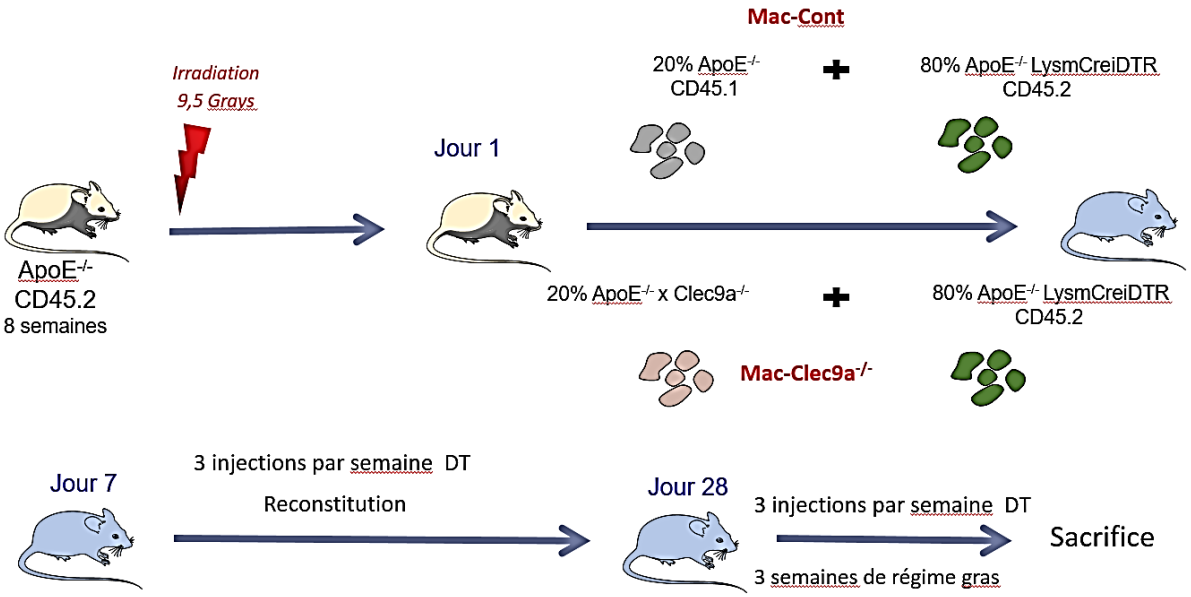


Figure 33 : Protocole de délétion spécifique de Clec9a dans les macrophages

Le chimérisme a été analysé par cytométrie en flux. Toutes les cellules analysées sont CD45.2+ et proviennent donc de la moelle ApoE$^{-/-}$LyMcre/iDTR, à l'exception des macrophages qui proviennent de la moelle osseuse CD45.1 (Figure 34).

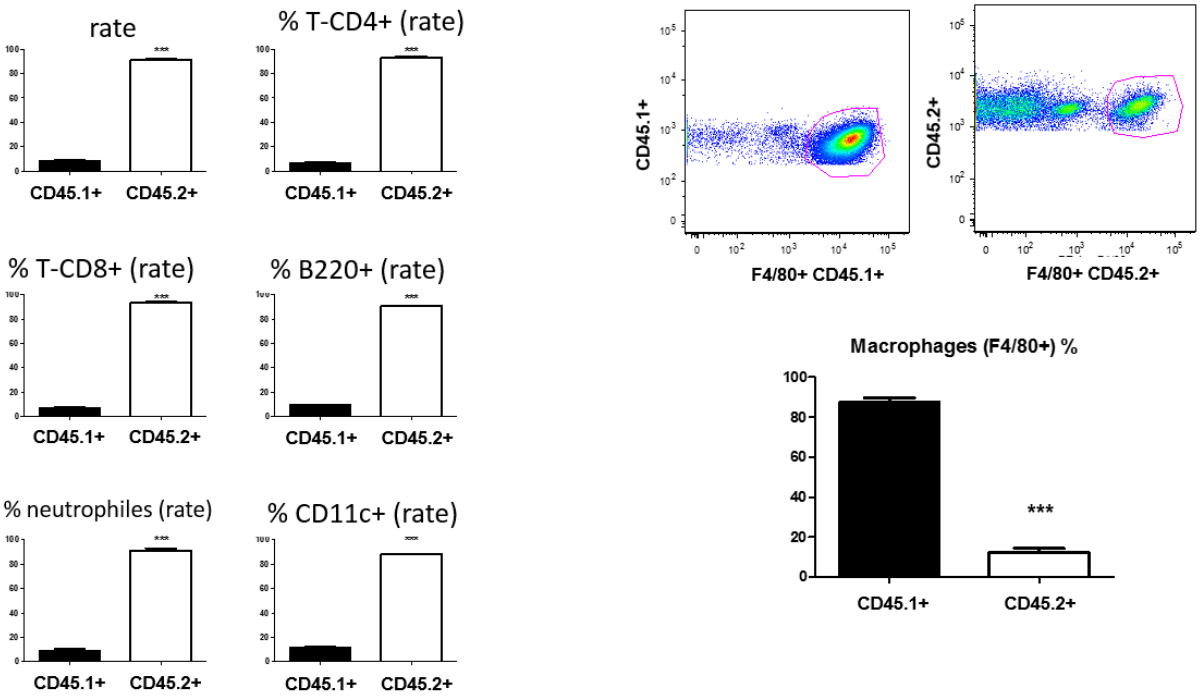


Figure 34 : Evaluation du chimérisme dans le sang, dans la rate et dans le péritoine

L'analyse des lésions au niveau du sinus aortique des souris révèle une diminution significative de la taille des lésions en l'absence d'expression de Clec9a dans les macrophages, suggérant également l'implication de cette population cellulaire dans le phénotype observé (Figure 35).

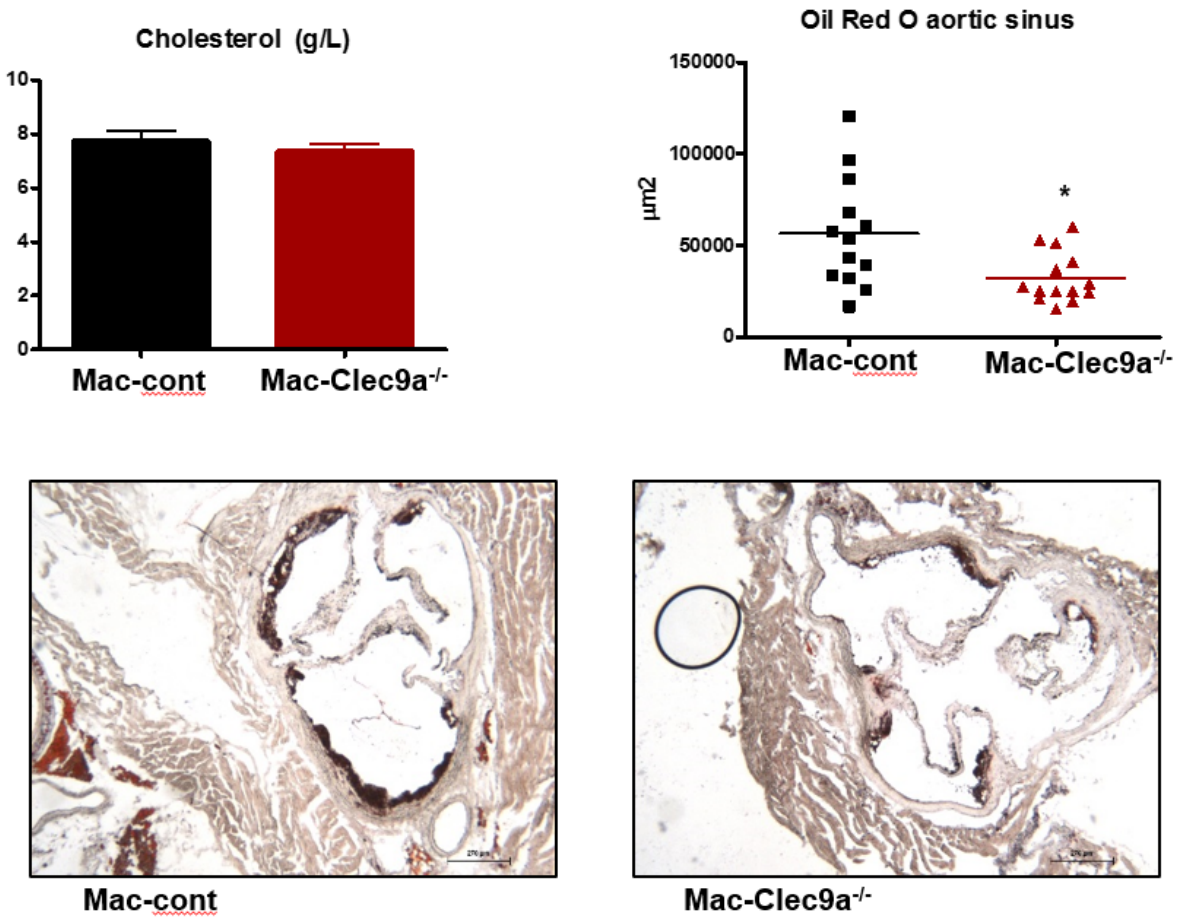


Figure 35 : Evaluation de la délétion de Clec9a dans les macrophages sur le développement de l'athérosclérose

6 DISCUSSION

6.1 Spécificité du récepteur Clec9a

Clec9a appartient au groupe V de la superfamille des CLRs avec Dectin-1 et Clec2 qui partagent des caractéristiques communes. En effet, tous ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire capable de reconnaitre un ligand spécifique. Le domaine transmembranaire de ces récepteurs est caractérisé par un domaine hemITAMs (ou ITAMs-like) comportant une tyrosine qui peut être phosphorylée, après l'activation du récepteur par son ligand, pour recruter et activer la kinase SYK[280]. Cependant, malgré cette structure commune, Clec9a développe des fonctions spécifiques (Figure 36). En effet, Clec9a est capable de reconnaître les corps nécrotiques contrairement à Dectin-1 et Clec2[324]. D'autre part, l'activation de Clec9a n'entraine pas l'activation des DCs[321], contrairement à Dectin-1 par exemple, qui une fois activé, stimule la voie NFκB et l'activation des DCs[285]. Clec9a est internalisé après son activation et régule la maturation endosomale, qui est une étape importante de la cross présentation[326]. Un autre CLR, MINCLE aussi appelé Clec4e, est également capable de reconnaître les corps nécrotiques mais diffère de Clec9a à plusieurs niveaux[311]. MINCLE, peut aussi reconnaître d'autres antigènes fongiques[312, 314], la structure des domaines de reconnaissance doit donc être différentes de celle de Clec9a (antigènes fongiques et nécrotiques). De plus, le domaine intracellulaire est associé à un adaptateur qui contient un domaine ITAM (et non hemITAM) et qui pourrait donc activer des voies de signalisation différentes de celle de Clec9a.

Figure 36 : Rôle de la signalisation via SYK dans l'activation des DCs par Clec9a et Dectin-1 (d'après Reis E Sousa C EMBO Mol Med. 2017)

6.2 Diminution de la taille des lésions en l'absence de Clec9a

A partir des 2 modèles murins, ApoE$^{-/-}$ et chimères LDLr$^{-/-}$, nous avons montré que l'absence de Clec9a entraine une diminution significative de la taille des lésions lorsque l'augmentation du cholestérol plasmatique reste modérée. De manière surprenante, cet effet est observé dès les stades précoces, soit après 5 et 7 semaines de régime hyperlipidique dans le modèle de souris chimères LDLr$^{-/-}$ ou chez des souris ApoE$^{-/-}$ âgées de 20 semaines, nourries avec un régime normal. En effet, les lésions précoces sont caractérisées par une activité d'efférocytose relativement importante et efficace, si bien que la présence de corps apoptotiques et nécrotiques est très faible, ce qui nous permet donc de se poser la question de savoir comment Clec9a est activé à l'étape précoce du développement des plaques d'athérosclérose. Différentes hypothèses sont envisageables afin d'expliquer ces résultats.

Il est possible que la faible présence des corps nécrotiques aux stades précoces soit suffisante pour activer Clec9a. D'autre part, l'activation de Clec9a par l'intermédiaire d'un autre ligand, qui n'est pas encore identifié, n'est pas non plus à écarter.

La kinase SYK, qui est activée par Clec9a, est également impliquée dans la signalisation d'autre type de récepteurs comme les TLRs[339]. Notre hypothèse est que Clec9a peut interagir avec d'autre récepteur comme les TLRs. De plus, il a été montré récemment qu'au niveau des plaques, les LDLs modifiées (minimally OxLDL) pouvait stimuler la voie TLR4/SYK[260]. Clec9a pourrait interagir avec le TLR4. Une interaction directe entre les 2 récepteurs est aussi envisageable, et pourrait notamment être analysée par co-immunoprécipitation (Figure 37).

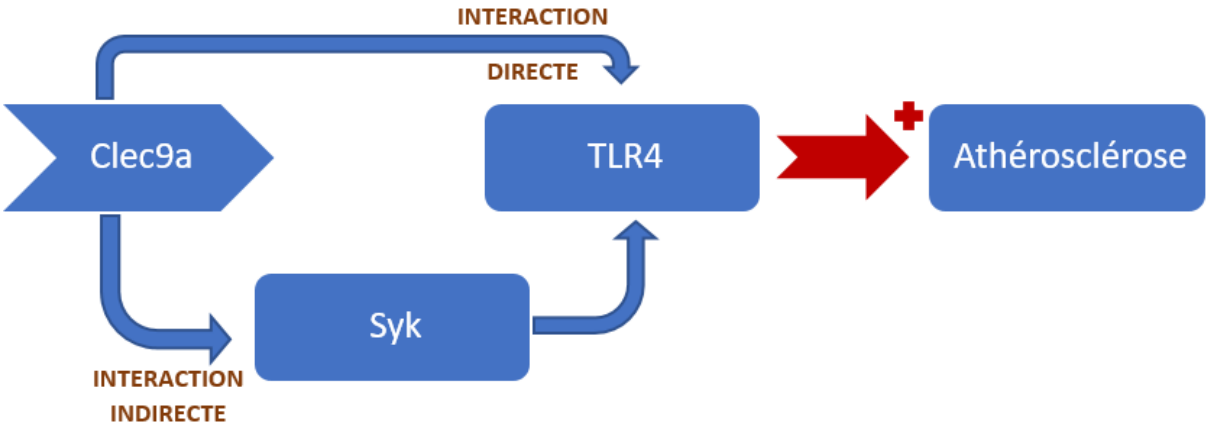


Figure 37 : Hypothèse sur le mécanisme de Clec9a sur la taille des plaques

6.3 Rôle de l'hypercholestérolémie sur l'expression de Clec9a

Nous avons montré que lorsque le cholestérol est élevé, après un régime gras de 13 semaines dans le modèle de souris chimères LDLr$^{-/-}$ ou de 6 semaines pour le modèle ApoE$^{-/-}$, il n'y avait plus d'effet de Clec9a sur la taille des lésions. Ceci est dû probablement à une diminution de son expression en présence d'une hypercholestérolémie sévère. Les résultats de nos études in vitro ont montré que l'augmentation de cholestérol pouvait inhiber l'expression de Clec9a.

Nous ne connaissons pas les mécanismes impliqués dans cette diminution de l'expression de Clec9a. Le cholestérol est un élément essentiel de la membrane plasmique. L'organisation lipidique de la membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la régulation de l'activation de certains récepteurs comme le Dectin-1[340]. En effet, l'activation de Dectin-1 dépend de la structure des micro-domaines appelés « lipid raft » ou « radeaux lipidiques ». La déstabilisation de ces radeaux lipidiques dérégule l'activation de Dectin-1[340]. A ce jour, aucun rôle de ces radeaux lipidiques sur la modulation de Clec9a n'a été rapporté. Cependant Clec9a, qui a la même structure que le dectin-1[280], pourrait également dépendre des radeaux lipidiques pour exercer sa fonction.

Il a été montré que les OxLDLs peuvent entrainer un stress du RE et activer la réponse UPR[341]. Récemment, il a été montré que la réponse au stress du RE pourrait diminuer l'expression de MINCLE[318]. Nous n'avons pas évalué l'implication de cette voie dans notre étude. Cependant, l'expression de Clec9a, qui comme MINCLE, peut être activé par la reconnaissance des corps nécrotiques, pourrait également être diminuée par la réponse UPR. Il serait donc intéressant d'analyser la modulation des différents facteurs impliqués dans cette réponse, comme Chop, Ire1α et Xbp1, sur l'expression de Clec9a (Figure 38).

L'activation de Clec9a entraine son internalisation dans des endosomes de recyclages EEA1, Rab5a et Rab27a [326]. L'excès de cholestérol pourrait donc induire l'internalisation de Clec9a pour réduire son expression à la surface de la membrane cellulaire et donc son activationFigure 38. On pourrait vérifier cette hypothèse in vitro, en traitant des DC-CD8α$^+$ avec des doses croissantes de cholestérol et évaluer la localisation endosomale de Clec9a par immunofluorescence, puis en quantifiant la co-localisation de Clec9a avec les marqueurs d'endosomes EEA1, Rab5a et Rab27a.

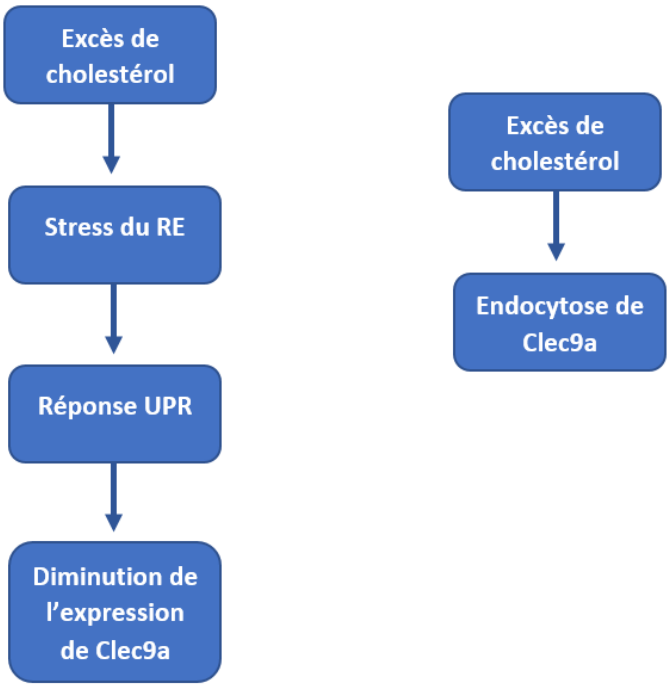


Figure 38 : Hypothèse sur la modulation de l'expression de Clec9a par le cholestérol

6.4 Augmentation de la production de l'IL-10

Nos résultats suggèrent un rôle important de la production de l'IL-10 dans le phénotype athéroprotecteur observé en l'absence de Clec9a.

L'expression de l'IL-10 est augmentée après 5 et 7 semaines de régime hyperlipidique. Cependant après 13 semaines de régime hyperlipidique, quand la taille des lésions n'est pas modifiée, l'expression de l'IL-10 n'est pas modifiée. La double déficience totale ou spécifique aux DC-CD8α^+ de Clec9a et IL-10 abolie la différence de taille de plaques observée soulignant le rôle essentiel de la production de l'IL-10 dans les effets médiés par Clec9a.

La signalisation stimulée par Clec9a entraine le recrutement et l'activation de la kinase SYK, qui pourrait donc intervenir dans la modulation de la production de l'IL-10. Nous avons donc voulu tester cette hypothèse dans notre modèle. Pour cela, nous avons traité des splénocytes avec du LPS, pour augmenter la production d'IL-10, en présence d'un inhibiteur pharmacologique de SYK et nous avons observé qu'il n'y a pas de différence de production d'IL-10 en l'absence de Clec9a.

Il semblerait donc que SYK soit impliqué dans la production d'IL-10 en l'absence de Clec9a in vitro. Cependant, nous ne savons pas si SYK agit de manière activatrice ou inhibitrice. Les données sur l'implication de SYK dans la production de l'IL-10 semblent contradictoires. La majorité des études ont montré que SYK pouvait induire la production de l'IL-10 en activant la voie Erk dans les DCs[342]. Mais il a été aussi montré que SYK pouvait réguler négativement la production de l'IL-10[343]. Un mécanisme que l'on peut envisager serait par exemple une interaction entre Clec9a et d'autres TLRs via le recrutement de la kinase SYK. En particulier, SYK est important pour la production de l'IL-10 via l'activation de TLR4, par les minimally oxidized LDLs, qui est impliqué dans la modulation de l'athérosclérose[344]. Il serait

donc intéressant d'étudier les mécanismes impliqués dans la modulation de la production de l'IL-10 par la kinase SYK.

6.5 Rôle des DC-CD8α^+ dans la production d'IL-10

L'athéroprotection observée en l'absence de Clec9a dans les DC-CD8α^+ pourrait stimuler une réponse T-CD4+. Ce résultat est inattendu car Clec9a est impliqué dans la cross présentation et donc dans l'activation d'une réponse T-CD8+. Une étude récente suggère un rôle anti-athérogène d'une population de T-CD8+ régulatrice[156]. Seulement, nos résultats ne montrent aucune modification du nombre ou de l'activation des T-CD8+, ni de différence de production de cytokines (IL-17, IFNγ et IL-10) par ces cellules. De manière intéressante, nous avons montré que la production de l'IL-10 par les DC-CD8α^+ entraine une augmentation de la production de l'IL-10 par les T-CD4+. Ces résultats suggèrent probablement un effet paracrine de l'IL-10 produit par les DC-CD8α^+ sur les LT-CD4+. Conformément à cette hypothèse, une étude suggère également que les DC-CD8α^+ peuvent moduler la réponse T-CD4+ de la rate[331]. La production de l'IL-10 par les macrophages peut également participer à l'activation de l'IL-10 par les T-CD4+[345]. Pour confirmer cette hypothèse, nous pouvons faire des expériences de co-culture de macrophages de la même manière que les co-cultures de DCs issues des 4 groupes de souris chimères (DC-Cont, DC-Clec9a$^{-/-}$, DC- Il-10$^{-/-}$, DC-Clec9a$^{-/-}$Il-10$^{-/-}$), avec des T-CD4+ de souris contrôles, et évaluer la production de l'IL-10 par les T-CD4+ D'autres expériences complémentaires peuvent également être utilisées afin de caractériser d'avantage le rôle des T-CD4+ dans le développement des lésions dans notre modèle. En particulier, l'utilisation d'un anticorps déplétant anti-CD4+, dans nos modèles, permettrait de savoir si l'athéroprotection observée en l'absence de Clec9a est médiée par les LT-CD4+.

7 CONCLUSION

A partir de différents modèles murins, nous avons montré que Clec9a joue un rôle important dans le développement de l'athérosclérose lorsque l'augmentation du cholestérol reste modérée. Nous avons également montré que Clec9a est impliqué dans la modulation de la production de l'IL-10, qui est une cytokine antiathérogène suggérant que Clec9a pourrait représenter une cible thérapeutique dans le développement de l'athérosclérose.

8 ANNEXES

8.1 Article de thèse

Molecular Medicine

The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Promotes the Development of Atherosclerosis in Mice

Yacine Haddad, Charlotte Lahoute, Marc Clément, Ludivine Laurans, Sarvenaz Metghalchi, Lynda Zeboudj, Andreas Giraud, Xavier Loyer, Marie Vandestienne, Julien Wain-Hobson, Bruno Esposito, Stephane Potteaux, Hafid Ait-Oufella, Alain Tedgui, Ziad Mallat, Soraya Taleb

Rationale: **Necrotic core formation during the development of atherosclerosis is associated with a chroni inflammatory response and promotes accelerated plaque development and instability. However, the molecula links between necrosis and the development of atherosclerosis are not completely understood. Clec9a (C-typ lectin receptor) or DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) is preferentially expressed by the CD8α subset of dendritic cells (CD8α⁺ DCs) and is involved in sensing necrotic cells. We hypothesized that sensing o necrotic cells by DNGR-1 plays a determinant role in the inflammatory response of atherosclerosis.**

Objective: **We sought to address the impact of total, bone marrow–restricted, or CD8α⁺ DC–restricted deletion o DNGR-1 on atherosclerosis development.**

Methods and Results: **We show that total absence of DNGR-1 in Apoe (apolipoprotein e)–deficient mice (*Apoe*$^{-/-}$ and bone marrow–restricted deletion of DNGR-1 in Ldlr (low-density lipoprotein receptor)–deficient mice (*Ldlr*$^{-/-}$ significantly reduce inflammatory cell content within arterial plaques and limit atherosclerosis development i a context of moderate hypercholesterolemia. This is associated with a significant increase of the expression o interleukin-10 (IL-10). The atheroprotective effect of DNGR-1 deletion is completely abrogated in the absence o bone marrow–derived IL-10. Furthermore, a specific deletion of DNGR-1 in CD8α⁺ DCs significantly increase IL-10 expression, reduces macrophage and T-cell contents within the lesions, and limits the development o atherosclerosis.**

Conclusions: **Our results unravel a new role of DNGR-1 in regulating vascular inflammation and atherosclerosi and potentially identify a new target for disease modulation. (*Circ Res*. 2017;121:234-243. DOI: 10.1161 CIRCRESAHA.117.310960.)**

Key words: atherosclerosis ■ dendritic cell ■ DNGR-1 ■ inflammation ■ interleukin-10 ■ necrosis

Accumulation of apoptotic cells and necrotic debris within the lipid core is a major feature of advanced atherosclerotic lesions and has been associated with increased susceptibility to thrombotic complications after plaque rupture.[1–4] We and others have shown that accumulation of apoptotic and secondary necrotic debris in atherosclerotic lesions results from defective efferocytosis or clearance of apoptotic cells.[3–5] This in turn leads to activation of immune-inflammatory responses and accelerates the progression of atherosclerosis.[3,5,6] Mouse models of decreased efferocytosis, such as mice lacking the receptor MERTK (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) or the bridging molecule MFGE8 (milk fat globule EGF-like factor 8) showed an alteration of the protective immune response, associated with increased vascular inflammation and enhanced necrotic core formation.[7–9] However, the mechanisms involved in necrosis-induced inflammation dur ing atherosclerosis development are not fully understood.

In This Issue, see p 197

Dying cells release endogenous molecules known a damage-associated molecular patterns that are recognized by pattern recognition receptors in immune cells. TLRs (toll-like receptors) and CLRs (C-type lectin receptors) are 2 main pat tern recognition receptor families expressed on immune cells including macrophages and dendritic cells (DCs). DNGR 1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1), also known a CLEC9a, is a type II transmembrane CLR containing a singl extracellular C-type lectin-like domain and a cytoplasmic tai with a hemi-immunoreceptor tyrosine-based activation moti that allows recruitment/activation of the SYK (spleen tyrosin

Original received March 10, 2017; revision received June 6, 2017; accepted June 9, 2017. In May 2017, the average time from submission to first decisio for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 12.28 days.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), Unit 970, Paris Cardiovascular Research Center, Université Paris-Descartes France (Y.H., C.L., L.L., S.M., L.Z., A.G., X.L., M.V., J.W.-H., B.E., S.P., H.A.-O., A.T., Z.M., S.T.); and Division of Cardiovascular Medicine, Universit of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, United Kingdom (M.C., Z.M.).

The online-only Data Supplement is available with this article at http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA 117.310960/-/DC1.

Correspondence to Ziad Mallat, MD, PhD, Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 2QQ, Unite Kingdom. E-mail zm255@medchl.cam.ac.uk or Soraya Taleb, PhD, INSERM 970 Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France. E-mail soraya taleb@inserm.fr

© 2017 American Heart Association, Inc.

Circulation Research **is available at http://circres.ahajournals.org** **DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.31096**

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

Novelty and Significance

What Is Known?

- Advanced atherosclerotic plaques are characterized by an increase in necrotic cells.
- A necrotic core increases plaque instability.
- The DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) is involved in sensing necrotic cells.

What New Information Does This Article Contribute?

- The DNGR-1, specifically expressed by a subtype of dendritic cells (CD8α⁺ DCs), has proinflammatory and proatherogenic effects that depend on interleukin-10.
- A new role of DNGR-1 in regulating vascular inflammation and atherosclerosis, making it a potential target that could be blocked to promote plaque stabilization.

Accumulation of necrotic debris increases inflammation in atherosclerotic lesions and has been associated with higher susceptibility to plaque rupture. However, the mechanisms that contribute to necrosis-induced inflammation during atherogenesis remain unclear. DNGR-1 is a sensor of necrotic cells that is preferentially expressed in a subtype of dendritic cells (CD8α⁺ DCs). We have shown that in a context of moderate hypercholesterolemia the total, bone marrow and CD8α⁺ DC-specific DNGR-1 deletion decreased the infiltration of T lymphocytes and macrophages within lesions and plaque size. Mechanistically, the absence of DNGR-1 led to increased expression of Il-10 in CD8α⁺ DCs, which also appeared to impact the production of interleukin-10 by CD4⁺ cells. Moreover, deletion of Il-10 in CD8α⁺ DCs abolished the atheroprotective effects of DNGR-1 deficiency. Further studies are required to determine whether increased DNGR-1 is associated with the formation of thin-cap fibroatheromatous lesions in humans and whether blockage of this protein would promote plaque stabilization.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

CLEC4e	C-type lectin receptor 4e
CLRs	C-type lectin receptors
DC	dendritic cell
DNGR-1	dendritic cell NK lectin group receptor-1
GFP	green fluorescent protein
HFD	high-fat diet
IL-10	interleukin-10
MERTK	myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
MFGE8	milk fat globule EGF-like factor 8
SYK	spleen tyrosine kinase
TLR	toll-like receptor

kinase) pathway.[10,11] DNGR-1 is mostly expressed by the CD8α⁺ subset of DCs (CD8α⁺ DCs) as a receptor for necrotic cells, which favors cross-priming of cytotoxic T lymphocytes to dead cell–associated antigens in mice.[11] Although this receptor is not essential for particle uptake via phagocytosis,[11] DNGR-1 is capable of internalizing bound antigens via endocytosis and directing them to the endosomal vesicles for cross-presentation of dead cell–associated antigens by CD8α⁺ DCs.[12,13]

Our hypothesis is that accumulation of apoptotic and necrotic debris during the development of atherosclerosis activates DNGR-1, leading to disease progression. Here, we show that DNGR-1 expression in hematopoietic cells and particularly in CD8α⁺ DCs promotes atherosclerosis through downregulation of the anti-inflammatory and antiatherogenic cytokine, IL-10.

Methods

Detailed methods can be found in the Online Data Supplement.

Animals

Il10$^{-/-}$, *Apoe*$^{-/-}$, and *Ldlr*$^{-/-}$ mice were from the Jackson Laboratory. C57BL/6 *Clec9a*$^{-/-}$ mice are from Reis e Sousa laboratory.[11] *Clec9a*$^{-/-}$ mice were backcrossed on C57Bl/6 for >10 generations. Littermates C57BL/6 *Clec9a*$^{-/-}$ and C57BL/6 *Clec9*$^{+/+}$ were used in all the experiments. Briefly, these mice are *Clec9a*$^{gfp/gfp}$ in which DNGR-1 expression is abrogated by the insertion of a gene encoding a membrane-anchored form of GFP (green fluorescent protein) into the *Clec9a* open-reading frame.[11] CD8α⁺ DC–deficient (*Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$) mice were obtained by crossing *Irf8*$^{flox/flox}$ (Jax) with *Cd11c*$^{Cre+}$ (Jax). *Mfge8*$^{-/-}$ mice were previously described.[14] *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$, *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$, and *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ mice were generated by crossing, respectively, *Apoe*$^{-/-}$ to *Clec9a*$^{-/-}$, *Il-10*$^{-/-}$ to *Clec9a*$^{-/-}$, and *Mfge8*$^{-/-}$ to *Clec9a*$^{-/-}$ mice. *Apoe*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ male mice on either chow diet (20 weeks) or high-fat diet (HFD; 6 weeks) were used in some experiments. We subjected 7- to 10-week-old *Ldlr*$^{-/-}$ male mice to medullar aplasia by 9.5 gray lethal total body irradiation. We repopulated the mice with an intravenous injection of bone marrow cells isolated from femurs and tibias of age- and sex-matched C57Bl/6J mice: *Clec9a*$^{+/+}$, *Clec9a*$^{-/-}$or *Il10*$^{-/-}$or *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$or *Mfge8*$^{-/-}$ or *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ mice. After 4 weeks of recovery, mice were fed with a proatherogenic diet containing 15% fat, 1.25% cholesterol, and 0% cholate for 5, 7, or 13 weeks.

Finally, we irradiated *Ldlr*$^{-/-}$ mice and transplanted them with 2:8 mixture of either control (CD45.1) bone marrow or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow mixed with bone marrow from CD8α⁺ DC–deficient (*Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$) mice. After 4 weeks of reconstitution, the mice were put on HFD diet for 7 weeks.

All mice used in these experiments were bred and housed in a specific pathogen-free barrier facility. Experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European community for experimental animal use (L358-86/609EEC).

Extent and Plaque Composition of Atherosclerotic Lesions

Quantification of lesion size and composition was performed as previously described.[15]

Flow Cytometry

Flow cytometric analysis was performed on single cell suspensions of spleen and peritoneal cells as mentioned before.[16]

Cell Recovery and Stimulation

Cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with Glutamax, 10% FCS, 0.02 mmol/L 2β-mercaptoethanol, and antibiotics. Splenocytes were stimulated with lipopolysaccharide (1 μg/mL; Sigma) for 48 hours, and then, supernatants were subjected to cytokine measurements. Spleen DCs, CD8α⁺ DCs, CD8α⁻ DCs, CD3⁺, and CD4⁺ T cells were purified using Miltenyi kits. To analyze

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

cytokine production by T cell, 10^5 $CD3^+$ or $CD4^+$ T cells were cultured alone or cocultured with 10^5 $CD8\alpha^+$ DCs in 96-well microplates (total volume 200 µL/well) precoated overnight at 4°C with anti-CD3 antibody (5 µg/mL; Pharmingen) and anti-CD28 antibody (1 µg/mL; Pharmingen) during 48 hours in the presence of lipopolysaccharide (1 µg/mL). Neutralizing anti–IL-10 receptor antibody or control IgG (R&D Systems) and water-soluble cyclodextrin-cholesterol (Sigma) were used in some experiments. On supernatants, ELISAs were performed to measure IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-α, IL-6, and interferon-γ (BD) of the different conditions.

Statistical Analysis

Values are expressed as means±SEM. Differences between values were examined using Student *t* test. Mann–Whitney test is applied in the animal studies. Values were considered significant at $P \leq 0.05$.

Results

DNGR-1 Deficiency Decreases the Development of Atherosclerosis

To study the role of DNGR-1 in atherosclerosis, we crossed *Clec9a*$^{-/-}$ mice with atherosclerosis-susceptible *Apoe*$^{-/-}$ mice and generated *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ mice and *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{+/+}$ littermate controls. Both groups were put on chow diet until euthanasia at 20 weeks of age. As shown in Figure 1, invalidation of DNGR-1 led to a marked 60% decrease of plaque size (P=0.002), despite no significant change in plasma cholesterol levels (Figure 1A through 1C). We also reconstituted lethally irradiated *Ldlr*$^{-/-}$ mice with *Clec9a*$^{+/+}$ or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow. After 4 weeks of recovery, mice were put on HFD for 5 or 7 weeks to study early disease stages and for 13 weeks to study advanced stages of atherosclerosis. As expected, plasma cholesterol levels significantly increased over time during HFD, without any significant differences between mice transplanted with *Clec9a*$^{-/-}$ or *Clec9a*$^{+/+}$ bone marrow cells (Online Figure IA). Mice reconstituted with *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow showed significant reduction in atherosclerosis at the aortic sinus (Figure 1D and 1E) compared with mice reconstituted with *Clec9a*$^{+/+}$ bone marrow after 5 or 7 weeks of HFD, confirming the atheroprotective effect of DNGR-1 deletion. Plaque area was also significantly decreased in the thoracic aorta after 7 weeks of HFD in mice reconstituted with *Clec9a*$^{-/-}$ compared with *Clec9a*$^{+/+}$ bone marrow (Figure 1F). However, DNGR-1 deletion in bone marrow–derived cells had no effect on atherosclerosis in mice fed HFD for 13 weeks (Figure 1D and 1E). Also, there was no difference in plaque size between *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{+/+}$ and *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ mice fed a HFD during 6 weeks (Online Figure IB and IC).

This was a surprising finding given that necrotic cores, which may activate signaling by DNGR-1, show increased accumulation in lesions at the advanced stages of atherosclerosis (Online Figure ID). To account for that finding, we hypothesized that the absence of DNGR-1 proatherogenic effects after 13 weeks of HFD in *Ldlr*$^{-/-}$ mice or after HFD in *Apoe*$^{-/-}$ mice was because of the high plasma cholesterol levels observed in these mice, rather than of the advanced stage of the plaques.

We then examined *Clec9a mRNA* in the spleen, a tissue known to readily express Clec9a[17] and to play a major role in atherosclerosis.[18,19] As shown in Online Figure IIA, Clec9a chimerism was high at all time points (7 or 13 weeks), as assessed by the almost total absence of Clec9a expression in

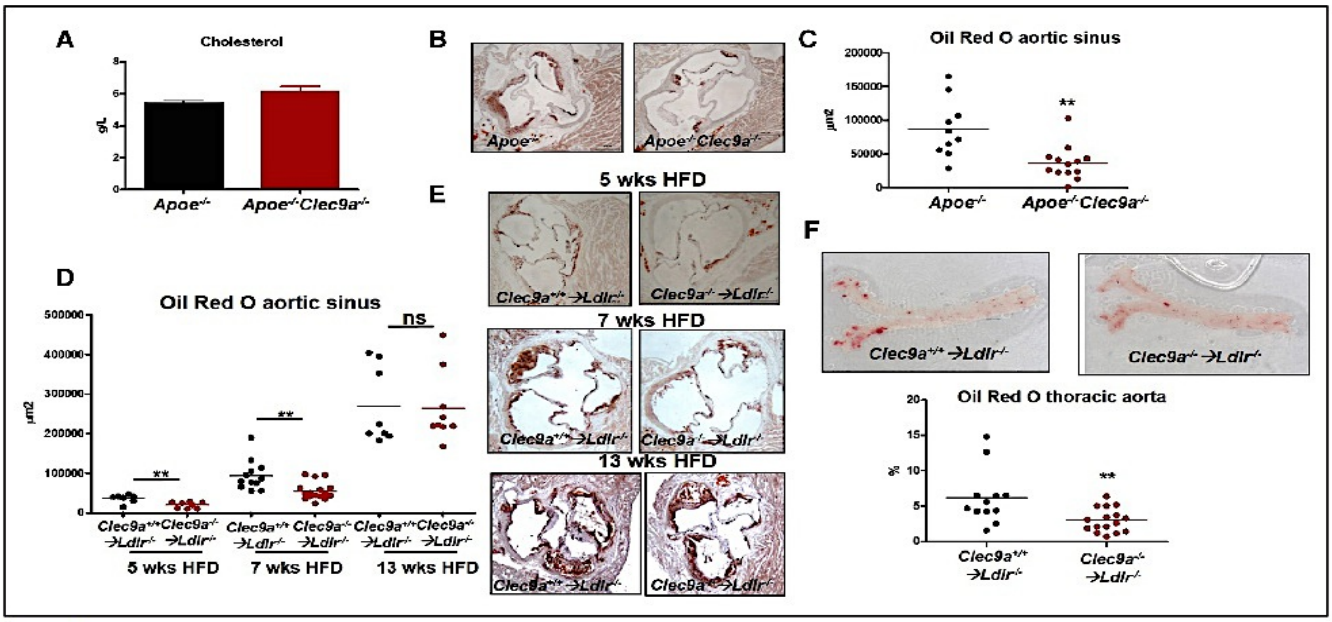


Figure 1. DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) deletion in bone marrow protects against atherosclerosis. A, Plasma cholesterol levels in 20-wk-old male *Apoe*$^{-/-}$ (n=10) and male *Apoe*$^{-/-}$ *Clec9a*$^{-/-}$(n=13) put on chow diet during 20 wk. **B** and **C,** Representative photomicrographs and quantification of lesion size in aortic sinus of male *Apoe*$^{-/-}$ (n=10) and male *Apoe*$^{-/-}$ *Clec9a*$^{-/-}$ mice (n=13). **D** and **E,** Representative photomicrographs and quantification of lesion size in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control (*Clec9a*$^{+/+}$→*Ldlr*$^{-/-}$) or *Clec9a*$^{-/-}$ (*Clec9a*$^{-/-}$ →*Ldlr*$^{-/-}$) bone marrow after 5 wk (control [n=7] and *Clec9a*$^{-/-}$ [n=8]) or 7 wk (control [n=12] and *Clec9a*$^{-/-}$ [n=16]) or 13 wk (control [n=8] and *Clec9a*$^{-/-}$ [n=9]) of high-fat diet (HFD). **F,** Representative photomicrographs and quantification of lesion size in the thoracic aorta reconstituted with either control (*Clec9a*$^{+/+}$→*Ldlr*$^{-/-}$ [n=12]) or *Clec9a*$^{-/-}$ (*Clec9a*$^{-/-}$→*Ldlr*$^{-/-}$ [n=16]) bone marrow after 7 wk of HFD. Mean values±SEM are shown. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

spleens of mice reconstituted with DNGR-1–deficient bone marrow. However, Clec9a expression in spleens of *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with *Clec9a*$^{+/+}$ bone marrow markedly decreased after 13 weeks of HFD, compared with that of *Ldlr*$^{-/-}$ mice on chow diet or after 7 weeks of HFD (Online Figure IIA). This may suggest that *Clec9a* expression was downregulated by the prolonged and severe hypercholesterolemia after 13 weeks of HFD. Consistent with this hypothesis, in vitro incubation of splenocytes from *Clec9a*$^{Gfp/Gfp}$ mice, in which the *Clec9a* gene was replaced by a GFP reporter gene (see Materials and Methods) in the presence of cholesterol markedly decreased GFP expression (Online Figure IIB).

To investigate the role of Clec9a in advanced atherosclerosis while avoiding severe and prolonged hypercholesterolemia, we generated *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ mice by crossing *Mfge8*$^{-/-}$ mice, in which the accumulation of late apoptotic/necrotic cells is increased because of defective efferocytosis,[20,21] with *Clec9a*$^{-/-}$ mice. Then, lethally irradiated male *Ldlr*$^{-/-}$ mice were reconstituted with either *Mfge8*$^{-/-}$ or *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ bone marrow cells and put on HFD for 7 weeks. As expected, a small apoptotic area as assessed by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) staining was detected in plaques of *Ldlr*$^{-/-}$mice reconstituted with *Clec9a*$^{+/+}$ or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow at this early stage of disease development (Online Figure IIIA and IIIB). As previously published,[9] Mfge8 deficiency markedly increased apoptotic TUNEL^{+} area (Online Figure IIIA and IIIB) and accelerated lesion development (Online Figure IIIC and IIID) under moderate hypercholesterolemia (5.01±0.66 versus 5.86±0.45 g/L; *P*=0.33, in wild-type and *Mfge8*$^{-/-}$ mice, respectively). No significant changes of necrotic core area was observed between *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ and *Mfge8*$^{-/-}$ groups (data not shown). Interestingly, atherosclerotic lesion size in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with *Mfge8*$^{-/-}$ bone marrow at 7 weeks of HFD was similar to that of *Ldlr*$^{-/-}$mice fed a HFD for 13 weeks. Remarkably, *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ bone marrow showed a marked reduction of atherosclerosis (Online Figure IIIC and IIID) as compared with mice transplanted with *Mfge8*$^{-/-}$ bone marrow, despite no change in plasma cholesterol levels (5.86±0.45 versus 6.19±0.33 g/L; *P*=0.56, in *Mfge8*$^{-/-}$ and *Clec9a*$^{-/-}$*Mfge8*$^{-/-}$ mice, respectively). This indicates that DNGR-1 promotes atherosclerosis even at advanced stages of lesion development but only in a context of moderate hypercholesterolemia.

DNGR-1 Mediates Proatherogenic Effects Through Downregulation of IL-10

We next assessed lesion composition in *Clec9a*$^{-/-}$→*Ldlr*$^{-/-}$ and *Clec9a*$^{+/+}$→*Ldlr*$^{-/-}$ mice after 5, 7, and 13 weeks of HFD. The percentage of macrophages (MOMA-2 staining/plaque surface) showed a significant decrease in mice reconstituted with DNGR-1–deficient bone marrow after 5, 7, or 13 weeks of HFD, compared with chimeric *Clec9a*$^{+/+}$ mice (Online Figure IVA). T-lymphocyte accumulation within the lesions (CD3 staining) significantly decreased in mice transplanted with *Clec9a*$^{-/-}$, compared with *Clec9a*$^{+/+}$ at 7 weeks of HFD (*P*=0.047; Figure 2A), but this effect was lost at 13 weeks of HFD (*P*=0.77; Figure 2B) when plasma cholesterol levels were excessively high.

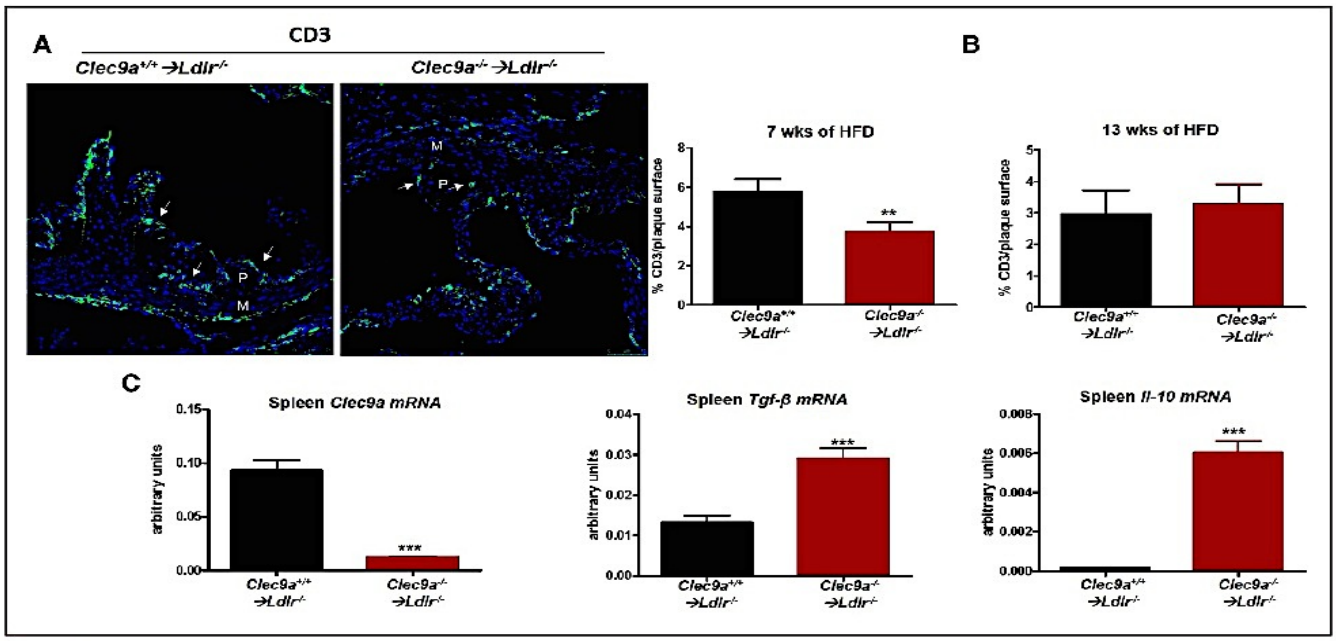


Figure 2. DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) deletion protects against vascular inflammation. A and **B**, Representative photomicrographs and quantitative analysis of lesional T-cell infiltration in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control (n=12) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=16) bone marrow after 7 wk or control (n=8) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) after 13 wk of high-fat diet (HFD). Plaque (P) and media (M) are indicated. The results showed a significant decrease of T cells % (CD3 area: plaque area) in the absence of DNGR-1 after 7 wk but not after 13 wk of HFD. **C**, *Clec9a*, *Tgf*-β, and *Il-10* mRNA in spleens of *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with Cont (n=7) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) bone marrow after 7 wk of HFD. The results show a significant increase of Tgf-β and Il-10 expression in the absence of DNGR-1. Mean values±SEM are shown. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.0001.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

We then examined the inflammatory profile in spleens of *Ldlr*$^{-/-}$mice reconstituted with either *Clec9a*$^{+/+}$or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow. The expression of major inflammatory cytokines involved in atherosclerosis, including *Ifn*γ, *Il1*β, and *Il6*[22] was not different between the 2 groups of mice after 7 weeks of HFD (Online Figure IVB). However, as shown in Online Figure VA and VB and Figure 2C, DNGR-1 deficiency after 5 and 7 weeks, but not after 13 weeks of HFD, markedly increased *Tgf*β and *Il10* expression, suggesting an anti-inflammatory and antiatherogenic phenotype.[23–26] We also found a significant increase of IL-10 production by splenocytes in the absence of DNGR-1 after lipopolysaccharide-TLR4 stimulation (Online Figure VC), without significant changes in tumor necrosis factor-α or IL-6 (data not shown), suggesting that DNGR-1 acts as a regulator of IL-10.

To directly address the physiological relevance of enhanced expression of IL-10 by DNGR-1–deficient bone marrow cells, we generated *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$ mice. We recovered bone marrow from *Il10*$^{-/-}$or *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$ mice to reconstitute lethally irradiated *Ldlr*$^{-/-}$mice. After 4 weeks of recovery, mice were put on HFD for 7 weeks. As previously reported,[27] IL-10 deficiency in the bone marrow accelerated lesion development (Figure 3A and 3B), despite no change in plasma cholesterol levels (5.00±0.78 versus 4.57±0.20 g/L; *P*=0.93). Strikingly, the observed atheroprotective effect of *Clec9a* deficiency (Figure 1D) was completely abolished in *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$→*Ldlr*$^{-/-}$ mice (Figure 3A and 3B), despite no impact on plasma cholesterol levels (4.57±0.20 versus 4.81±0.20 g/L; *P*=0.53). Clec9a expression in *Il10*$^{-/-}$→*Ldlr*$^{-/-}$ spleens is comparable to *Il10*$^{+/+}$→*Ldlr*$^{-/-}$, indicating that inflammation is not involved in the modulation of Clec9a expression (data not shown). Moreover, no significant differences in necrotic core area, macrophage, or T-cell infiltration were observed between *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with bone marrow cells from either *Il10*$^{-/-}$ or *Clec9a*$^{-/-}$ *Il10*$^{-/-}$ (Figure 3C through 3E). These data further demonstrate that the modulation of IL-10 expression is an important mechanism through which DNGR-1 mediates its proatherogenic effects.

DNGR-1 Expressed in CD8α$^+$ DCs Regulates IL-10 Production and Atherosclerosis Development

DNGR-1 is highly expressed in CD8α$^+$ DCs.[11] However, the role of CD8α$^+$ DCs in atherosclerosis is still poorly understood.[28,29] To address the direct role of CD8α$^+$ DC–specific DNGR-1 in atherosclerosis, we used irradiated *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with a 8:2 mixture of CD8α$^+$ DC–deficient (*Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*^{floxflox}; Online Figure VIA) CD45.2 bone marrow (80%), mixed with either *Clec9a*$^{+/+}$ (CD45.1) or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow (20%). In these chimeric mice, at least 80% of spleen cells other than CD8α$^+$ DCs, including T cells (CD4$^+$ and CD8$^+$), B cells (B220$^+$), CD8α$^-$ DCs, macrophages (F4/80$^+$), and neutrophils (GR1$^+$), derived from

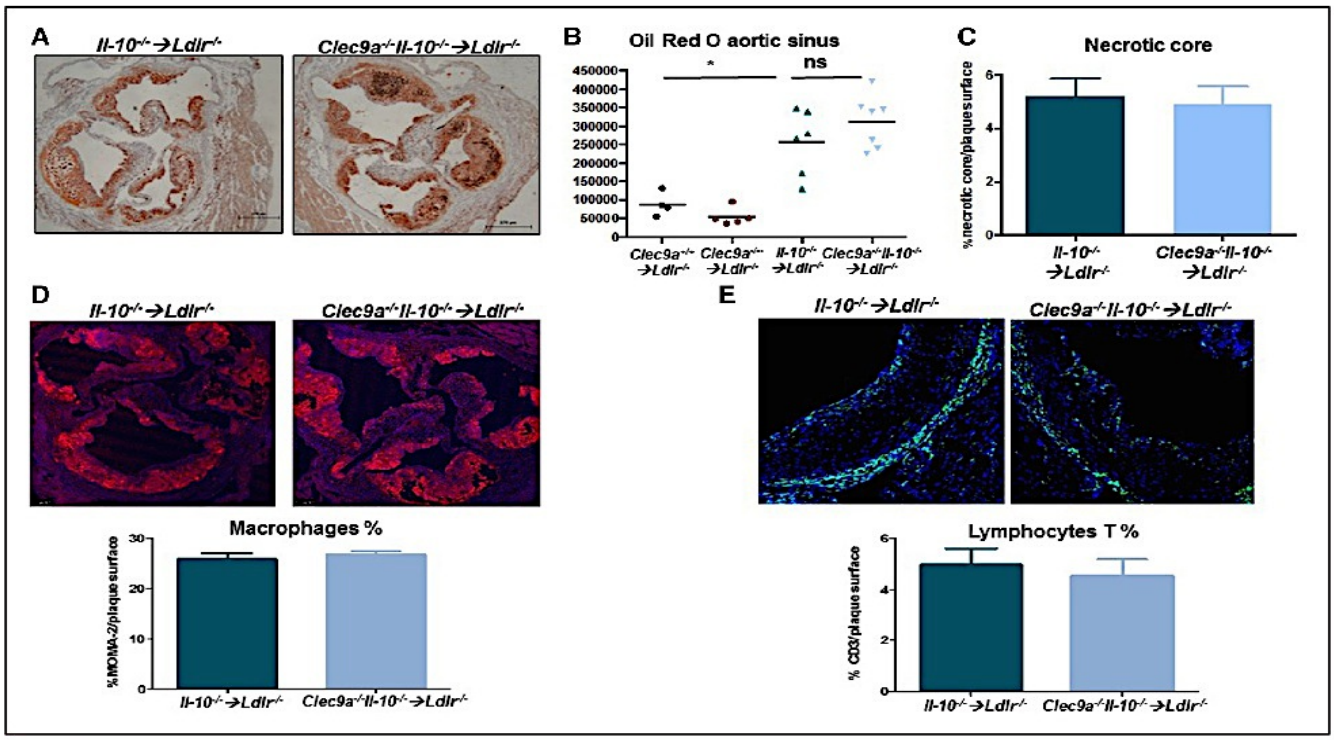


Figure 3. Il-10 (interleukin-10) deficiency abrogates atheroprotection in DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1)–deficient mice. A and **B**, Representative photomicrographs and quantification of lesion size in the aortic sinus of lethally irradiated male *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with bone marrow from *Clec9a*$^{+/+}$ (n=4) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=5) or *Il10*$^{-/-}$ (n=6) or *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$ (n=7) mice after 7 wk of high-fat diet (HFD). **C**–**E**, Representative photomicrographs and quantitative analysis of necrotic cores, lesional macrophage, and T-cell infiltration in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either *Il10*$^{-/-}$ (n=6) or *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$ (n=7) bone marrow after 7 weeks of HFD. The results show the importance of Il-10 in DNGR-1–mediated proatherogenic effects. Results were obtained after 4 weeks of recovery from bone marrow transplantation followed by 7 wk on a HFD. Mean values±SEM are shown. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.0001.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

the 80% *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ (CD45.2) bone marrow (Online Figure VIB; Figure 4A). On the contrary, we expected all CD8α$^+$ DCs to reconstitute almost exclusively from the 20% bone marrow (*Clec9a*$^{+/+}$ or *Clec9a*$^{-/-}$). In agreement with this, *Clec9a* mRNA was highly expressed in purified spleen CD8α$^+$ DCs of mice reconstituted with 80% *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$+20% *Clec9a*$^{+/+}$ bone marrow (CD8α$^+$ DC control) but markedly decreased in purified spleen CD8α$^+$ DCs of mice reconstituted with 80% *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$+20% *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow (CD8α$^+$ DC-*Clec9a*$^{-/-}$; Figure 4B). As expected, DNGR-1 was barely expressed in purified CD8α$^-$ DCs from spleens of both groups of mice (Figure 4B). Reconstitution of spleen DCs, and more particularly CD8α$^+$ DCs, was similar between the 2 groups of mice (Online Figure VIC).

Remarkably, the selective absence of DNGR-1 in CD8α$^+$ DCs significantly decreased plaque size (P=0.04; Figure 4C and 4D), despite no change in plasma cholesterol levels (6.69±0.25 versus 6.44±0.31 g/L; P=0.46). Moreover, macrophage and T-cell infiltration within the plaques were significantly decreased in the absence of DNGR-1 in CD8α$^+$ DCs, indicating that the expression of DNGR-1 in CD8α$^+$ DCs is required to mediate its proatherogenic effects (Online Figure VIIA; Figure 5A and 5B).

DNGR-1 has previously been shown to induce CD8$^+$ T-cell responses against dying cells.[30] However, we found no differences in spleen CD8$^+$ T-cell percentage or activation between the 2 groups of mice (Online Figure VIIB), suggesting the involvement of other mechanisms.

Interestingly, as in the total DNGR-1–deficient model, the specific deletion of DNGR-1 in CD8α$^+$ DCs led to a marked increase of IL-10 expression in those cells (Online Figure VIIC) but also more generally in the spleen (Figure 5C), showing that DNGR-1 specifically expressed by CD8α$^+$ DCs plays a major role in the regulation of IL-10. DNGR-1 was also detected in CD45$^+$ cells purified from atherosclerotic plaque aorta (Online Figure VIIIA), suggesting potential local effects. We also found higher *Il10* mRNA levels in aortas of mice with DNGR-1 deletion in CD8α$^+$ DCs compared with controls, without significant changes of *Tnfα*, *Il6*, and *Tgfβ* expression (Online Figure VIIIB).

The expression of *Il10* in CD8α$^+$ DCs and DCs in general was relatively weak, which suggests that DNGR-1 deficiency in CD8α$^+$ DCs likely increased IL-10 expression in other cell types. Accordingly, it was previously shown that IL-10, and particularly DC-derived IL-10, promoted IL-10–producing T regulatory (Tr1) cells.[31,32] In this regard, we found that coculture of splenic CD8α$^+$ DCs purified from *Il10*$^{-/-}$ mice with

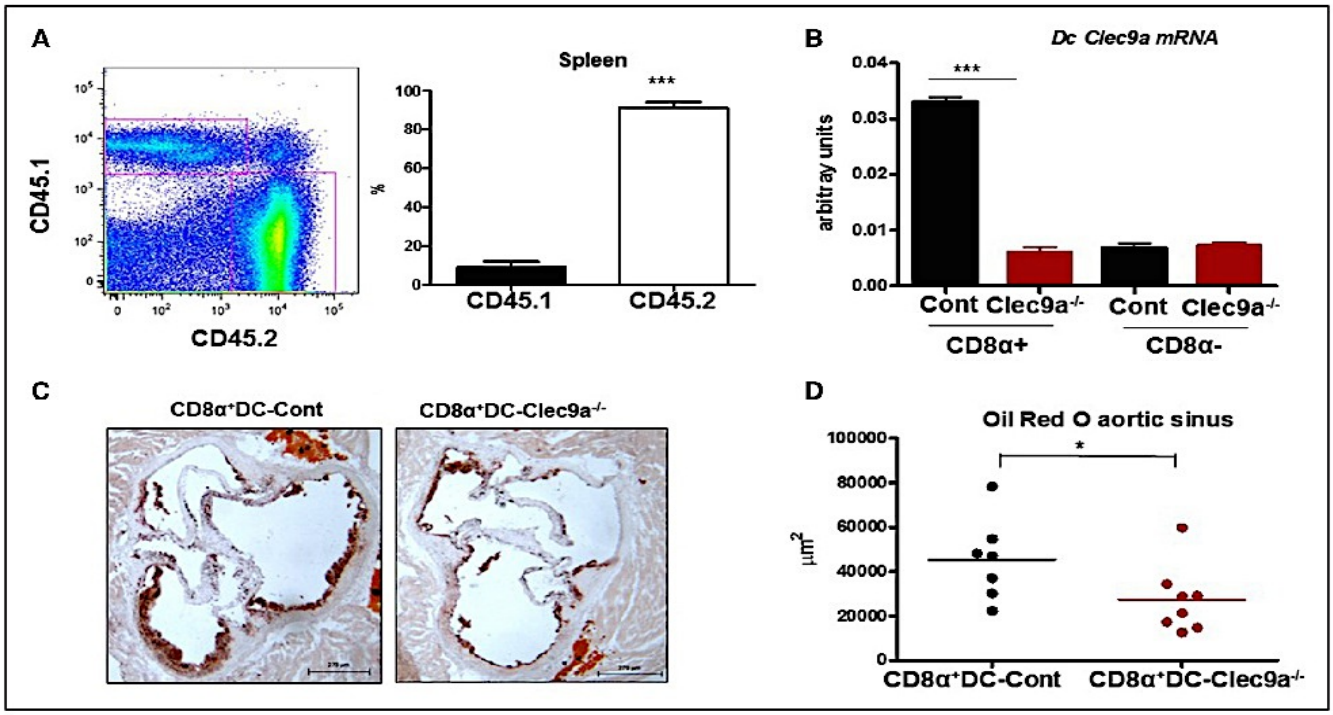


Figure 4. DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) deletion in CD8α$^+$ subset of dendritic cells (CD8α$^+$ DCs) protects against atherosclerosis. A, Representative example and quantitative analysis of flow cytometry-donor origin defined as CD45.1 % and CD45.2 % of spleen cells from chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with bone marrow mix (2:8) from control (CD45.1; n=7) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8) bone marrow cells mixed with *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ (CD45.2) bone marrow. After bone marrow reconstitution, the mice were put on a high-fat diet (HFD) during 7 wk. The results show that the majority of spleen cells (80%) originates from CD45.2 bone marrow. **B**, *Clec9a* mRNA in pooled purified CD8α$^+$ DCs isolated from either control group (CD8α$^+$ DC-Cont, n=7) or DNGR-1–deficient CD8α$^+$ DC group (CD8α$^+$ DC-*Clec9a*$^{-/-}$, n=8). **C** and **D**, Representative photomicrographs and quantification of lesion size in aortic sinus of chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with 2:8 mix of bone marrow from control (CD45.1; n=7) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8) bone marrow cells mixed with *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ (CD45.2) bone marrow. The results show that the deletion of DNGR-1 in CD8α$^+$ DCs protects against atherosclerosis. Mean values±SEM are shown. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

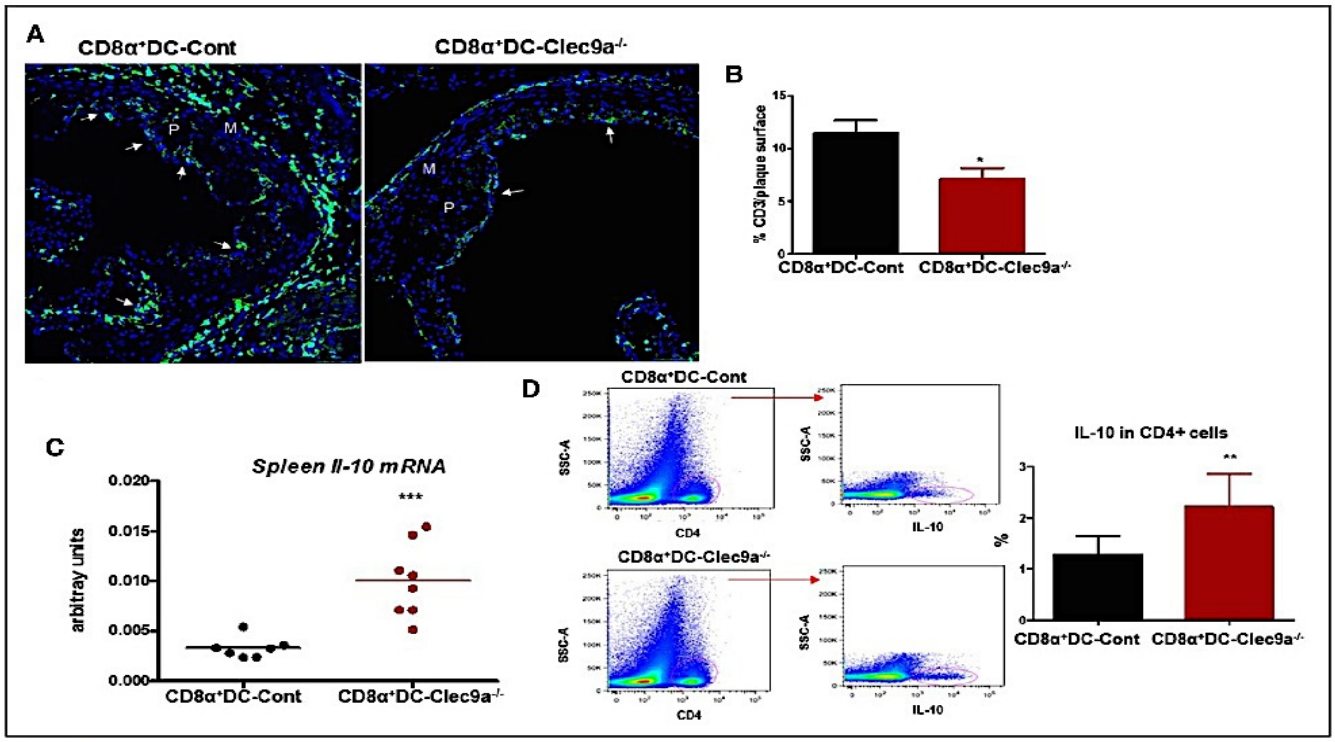


Figure 5. DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) deletion in CD8α⁺ subset of dendritic cells (CD8α⁺ DCs) alleviates inflammation in atherosclerosis. A and **B**, Potomicrographs and quantitative analysis of lesional T-cell infiltration in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control group (CD8α⁺ DC-Cont, n=7) or DNGR-1–deficient CD8α⁺ DC group (CD8α⁺ DC-Clec9a$^{-/-}$, n=8) after 7 wk of high-fat diet (HFD). Plaque (P) and media (M) are indicated. **C**, *Il-10* mRNA in spleens of control group (CD8α⁺ DC-Cont, n=7) or DNGR-1–deficient CD8α⁺ DC group (CD8α⁺ DC-Clec9a$^{-/-}$, n=8). **D**, Representative examples and quantitative analysis of flow cytometry–based intracellular staining of IL-10 gated on CD4⁺ cells from the DNGR-1–deficient CD8α⁺ DCs (n=8) compared with control-CD8α⁺ DCs (n=7) groups of mice. The results show the importance of DNGR-1 in CD8α⁺ DC–mediated proatherogenic effects. Mean values±SEM are shown. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.0001.

Il10$^{+/+}$ CD3⁺ T cells resulted in a significantly lower IL-10 production as compared with the coculture of *Il10*$^{+/+}$ CD8α⁺ DCs with *Il10*$^{+/+}$ CD3⁺ T cells, further highlighting the importance of CD8α⁺ DC-derived IL-10 to stimulate IL-10 production by T cells (Online Figure IXA). Furthermore, coculture of DNGR-1–deficient CD8α⁺ DCs with CD3⁺ T cells significantly increased IL-10 production by T cells without significant changes of interferon-γ or IL-17 (Online Figure IXB through IXD). In line with these results, the selective absence of DNGR-1 in CD8α⁺ DCs significantly increased IL-10 expression in T-CD4⁺ cells in vivo (Figure 5D), suggesting a specific bystander effect of DNGR-1 expressed in CD8α⁺ DCs on the regulation of IL-10 production by CD4⁺ cells. Of note, DNGR-1 in CD8α⁺ DCs did not affect the levels of T regulatory cells (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺; Online Figure XA).

To directly test the specific role of IL-10 expression in CD8α⁺ DCs in the presence or absence of DNGR-1, we irradiated and transplanted *Ldlr*$^{-/-}$ mice with 8:2 bone marrow from *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ (80%) mice, mixed with 20% of bone marrow from control (n=8), *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9), *Il10*$^{-/-}$ (n=8), or *Clec9a*$^{-/-}$*Il10*$^{-/-}$ (n=9) mice. Then, the mice were put on HFD during 7 weeks. As shown in Figure 6A through 6D, specific IL-10 deletion in CD8α⁺ DC abrogated the atheroprotection observed in absence of DNGR-1 in this cell type, without any significant change of plasma cholesterol levels. This was associated with the inability of Clec9a deficiency to increase IL-10 production by splenocytes (Figure 6E). Furthermore, coculture of CD8α⁺ DCs from each group with wild-type CD4⁺ T cells showed that CD8α⁺ DCs promoted increased IL-10 production by T cells in the absence of DNGR-1, which was dependent on IL-10 expression in CD8α⁺ DC (Online Figure XB) and most likely IL-10 receptor signaling in CD4⁺ T cells (Online Figure XC).

Discussion

Accumulation of apoptotic cells or debris during the development of atherosclerosis promotes inflammation and contributes to plaque growth and thrombosis on plaque rupture.[5,33] We recently showed that CLEC4e (C-type lectin receptor 4e), known to be involved in the sensing of necrotic cores, promoted atherosclerosis through induction of endoplasmic reticulum stress–dependent macrophage proliferation, inflammation, and foam cell formation.[34] However, other C-type lectin receptors could recognize necrotic cores and stimulate inflammation and plaque progression.

Our findings provide in vivo and in vitro evidence that DNGR-1, known to be involved in the sensing and presentation of antigens derived from necrotic cells,[12] is proatherogenic,

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

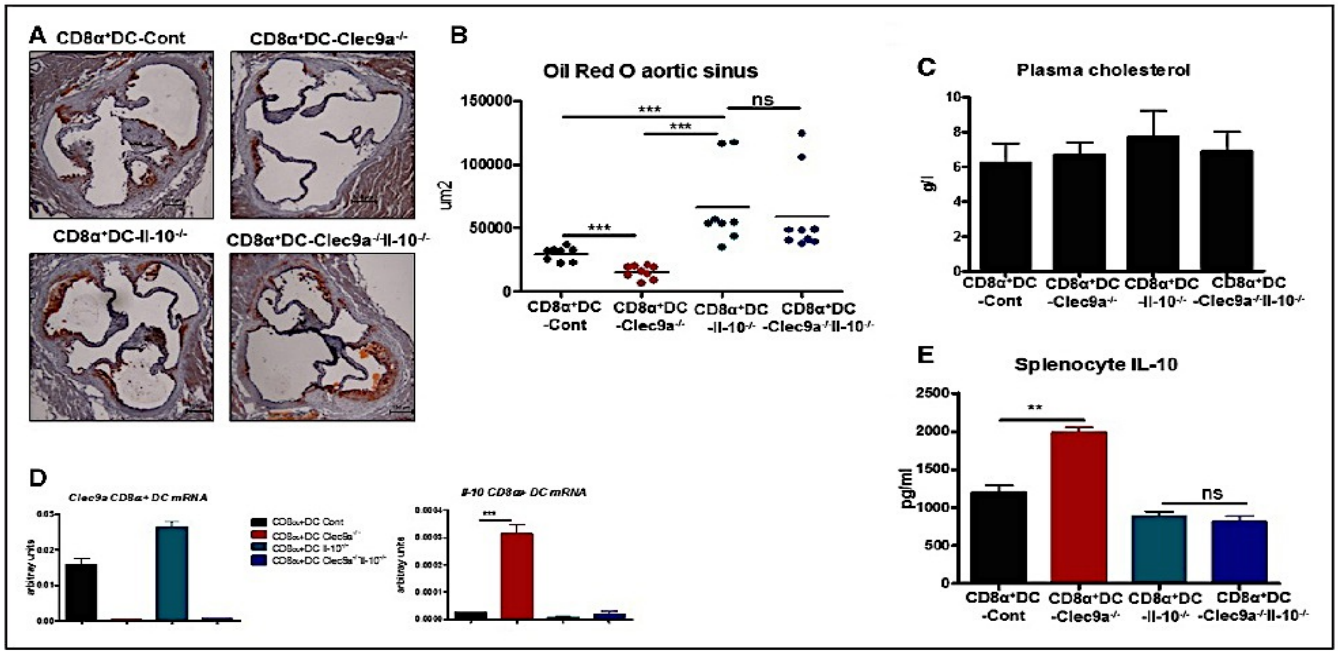


Figure 6. Interleukin-10 (IL-10) deletion abrogates protective effects of DNGR-1 (dendritic cell NK lectin group receptor-1) absence in CD8α⁺ subset of dendritic cells (CD8α⁺ DCs). **A** and **B**, Representative photomicrographs and quantification of lesion size in aortic sinus. **C**, Plasma cholesterol in chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with 2:8 mix of bone marrow from control (n=8) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) or *Il-10*$^{-/-}$ (n=8) or *Clec9a*$^{-/-}$*Il-10*$^{-/-}$ (n=9) bone marrow cells mixed with *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ bone marrow after 7 wk of high-fat diet (HFD). **D**, *Clec9a and Il-10* mRNA in pooled purified CD8α⁺ DCs isolated from either control group (CD8α⁺ DC-Cont, n=8) or DNGR-1–deficient CD8α⁺ DC group (CD8α⁺ DC-*Clec9a*$^{-/-}$, n=9) or IL-10–deficient CD8α⁺ DC group (CD8α⁺ DC-*Il-10*$^{-/-}$, n=8) or DNGR-1/IL-10–deficient CD8α⁺ DC group (CD8α⁺ DC-*Clec9a*$^{-/-}$*Il-10*$^{-/-}$, n=9). **E**, IL-10 production by anti-CD3 (5 μg/mL) and anti-CD28 (1 μg/mL) stimulated splenocytes from either CD8α⁺ DC-Cont (n=8) or CD8α⁺ DC-*Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) or CD8α⁺ DC-*Il-10*$^{-/-}$ (n=8) or CD8α⁺ DC-*Clec9a*$^{-/-}$*Il-10*$^{-/-}$ (n=9), in presence of lipopolysaccharide (1 μg/mL). The results show that the deletion of IL-10 abrogates the protective effects of DNGR-1 deletion in CD8α⁺ DCs. Mean values±SEM are shown. $P<0.05$, $^{**}P<0.001$, $^{***}P<0.0001$.

and its deletion in both *Ldlr*$^{-/-}$ and *Apoe*$^{-/-}$ mouse models promotes an anti-inflammatory response and deactivates important proatherogenic mechanisms. We have identified a new DNGR-1–regulated IL-10 pathway that controls vascular inflammation and substantially impacts lesion development. DNGR-1 deficiency inhibited macrophage and T-cell infiltration within the plaques and upregulated *Tgfb* and *Il10*, 2 major anti-inflammatory and antiatherogenic genes.[2,25] Intriguingly, the atheroprotective effect of DNGR-1 deletion was already observed at the early stages of atherosclerosis (5 or 7 weeks of HFD) when plaques were still relatively small and apoptotic cell death was barely detectable. Even though we cannot rule out the possibility that DNGR-1 was activated by some necrotic debris, it is likely that other pattern recognition receptors, including TLRs, were activated during atherosclerosis[35] and interacted with DNGR-1 signaling to activate inflammatory pathways. In agreement with this, our results showed that the absence of DNGR-1 in splenocytes increased the production of the anti-inflammatory factor IL-10 after TLR4 stimulation.

After 13 weeks of HFD, we no longer observed differences in plaque size in the absence of DNGR-1, despite the presence of necrotic cores. Also, the atheroprotection observed in absence of DNGR-1 in *Apoe*$^{-/-}$ mice fed with chow diet was abrogated when the mice were put on HFD. We think that this was because of reduced Clec9a expression caused by the high plasma cholesterol levels, as indicated by our in vitro experiments showing reduced CLEC9a expression by CD8α⁺ DCs in the presence of high cholesterol. In agreement with this, we found that DNGR-1 deletion was still atheroprotective in mice deficient for *Mfge8*, which exhibited after only 7 weeks of HFD (moderate hypercholesterolemia) increased accumulation of apoptotic/necrotic debris, and plaques as large as those found in *Mfge8*$^{+/+}$ mice after 13 weeks of HFD (severe hypercholesterolemia). In addition, previous studies showed that T cells become dispensable for atherosclerosis development after prolonged and severe hypercholesterolemia.[36,37] More recently, Tsaousi et al[38] reported that when *Apoe*$^{-/-}$ mice were fed a chow diet for 35 weeks, lesions were approximately the same size as after 12 weeks of HFD. Yet, T-bet–deficient *Apoe*$^{-/-}$ mice, in which T cells are unable to differentiate into a Th1 phenotype, exhibited fewer plaques compared with immunocompetent *Apoe*$^{-/-}$ mice after 35 weeks of chow diet, whereas T-bet deficiency had no atheroprotective effects in *Apoe*$^{-/-}$ mice fed a HFD for 12 weeks. As our data suggest that the protective effects of DNGR-1 deletion are dependent on T cells, this may explain why the atheroprotective effect is lost at high plasma cholesterol levels.

In agreement with our hypothesis of a role for DNGR-1 in adaptive immune responses, earlier studies showed a restricted DNGR-1 expression in CD8α⁺ DCs.[12,39] However,

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

existing reports about the role of CD8α⁺ DCs in atherosclerosis are contradictory. One study used FMS-like tyrosine kinase (*flt3*)$^{-/-}$ *Ldlr*$^{-/-}$ double deficient mice, which displayed marked depletion of CD8α⁺ DCs, suggested a proatherogenic role of CD8α⁺ DCs.[28] However, *flt3*$^{-/-}$ mice are also deficient for many other conventional DC subtypes. Moreover, in contrast to those results, atherosclerotic plaque formation and stability were not altered in chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with bone marrow from *Batf3*(basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3)–deficient mice that lack the CD8α⁺ DC subset, compared with *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with a control bone marrow.[29] Our study differs from the previous ones in that we report on the deletion of a specific pattern recognition receptor selectively expressed by CD8α⁺ DCs, while preserving the other functions of this DC subset. Our present results clearly indicate that the specific deletion of DNGR-1 in CD8α⁺ DCs promotes atherosclerosis, identifying a previously unrecognized proatherogenic function of CD8α⁺ DCs in the development of atherosclerosis.

DNGR-1 stimulation in CD8α⁺ DCs has been previously shown to mediate cross-presentation of dead cell–associated antigens leading to CD8⁺ T-cell activation.[11,40] Thus, we expected that DNGR-1 expressed in CD8α⁺ DCs under conditions of hyperlipidemia would lead to CD8⁺ T-cell activation. However, our results showed no significant changes in spleen CD8⁺ T-cell count or activation between control and DNGR-1–deficient mice, suggesting that cross-presentation may not be the main mechanism accounting for DNGR-1–mediated proatherogenic effects. In addition, the role of CD8⁺ T cells and cross-presentation in atherosclerosis is still debated.[29,41–43] Interestingly, we found that DNGR-1 deletion in CD8α⁺ DCs increased the expression of the anti-inflammatory and antiatherogenic IL-10 in spleens, suggesting the involvement of this cytokine in the observed atheroprotective effects. Noteworthy, spleen CD8α⁺ DCs purified from mice reconstituted with DNGR-1–deficient CD8α⁺ DCs showed a significantly higher IL-10 expression compared with control CD8α⁺ DCs. Yet, IL-10 expression by CD8α⁺ DCs was weak, suggesting an additional impact of DNGR-1 deficiency in CD8α⁺ DCs on IL-10 expression in other cell types. In agreement with this, we found that the absence of DNGR-1 in CD8α⁺ DCs led to increased IL-10 (but not IL-17 nor interferon-γ) production by CD4⁺ T cells, suggesting the induction of an anti-inflammatory and antiatherogenic T-cell response.

Our findings point to an important role of IL-10 as the main atheroprotective factor in the absence of DNGR-1. First, IL-10 expression was upregulated at 5 and 7 weeks of HFD in the absence of DNGR-1. However, after 13 weeks of high diet, when no difference of plaque size was observed, IL-10 expression remained unchanged in the absence of DNGR-1. Moreover, double deficiency in DNGR-1 and IL-10, specifically in CD8α⁺ DCs, completely abrogated the protective effects of DNGR-1 deletion. The mechanisms leading to an increase of IL-10 in the absence of DNGR-1 are still unknown and will require further investigation. One likely mechanism is that interaction between TLRs and DNGR-1 signaling modulates IL-10 production through the SYK pathway.[10,11,44,45]

In conclusion, our results identify a proatherogenic role for the necrotic cell sensor DNGR-1 through the regulation of IL-10 production and suggest a new potential therapeutic target to combat atherosclerosis.

Acknowledgments

The DNGR-1–deficient mice were provided by Caetano Reis e Sousa (Immunobiology Laboratory, London, UK). We thank members of our animal facility for their assistance in mouse care. We also thank Jose Vilar for his technical help. We gratefully thank David Sancho and Caetano Reis e Sousa for their critical reading of the article.

Sources of Funding

This work was supported by Inserm, European Research Council grant (Z. Mallat), the British Heart Foundation (Z. Mallat), United Kingdom, and the Fondation pour la Recherche Medicale, France. Y. Haddad is a recipient of fellowship from CODDIM, Ile-de-France, Paris. C. Lahoute was a recipient of fellowship from Fondation pour la Recherche Medicale.

Disclosures

None.

References

1. 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. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64641-X.
2. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res*. 2001;88:998–1003.
3. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med*. 2015;278:483–493. doi: 10.1111/joim.12406.
4. Tabas I, Bornfeldt KE. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:653–667. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306256.
5. Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, Mallat Z. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:887–893. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224873.
6. Thorp EB. Mechanisms of failed apoptotic cell clearance by phagocyte subsets in cardiovascular disease. *Apoptosis*. 2010;15:1124–1136. doi: 10.1007/s10495-010-0516-6.
7. Thorp E, Cui D, Schrijvers DM, Kuriakose G, Tabas I. Mertk receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1421–1428. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.167197.
8. Ait-Oufella H, Pouresmail V, Simon T, Blanc-Brude O, Kinugawa K, Merval R, Offenstadt G, Lesèche G, Cohen PL, Tedgui A, Mallat Z. Defective mer receptor tyrosine kinase signaling in bone marrow cells promotes apoptotic cell accumulation and accelerates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1429–1431. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.169078.
9. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, *et al*. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2007;115:2168–2177. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.662080.
10. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*. 2006;7:1258–1265. doi: 10.1038/ni1417.
11. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martínez D, Hernanz-Falcón P, Rosewell I, Reis e Sousa C. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*. 2009;458:899–903. doi: 10.1038/nature07750.
12. Sancho D, Mourão-Sá D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, Carlyle JR, Reis e Sousa C. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest*. 2008;118:2098–2110. doi: 10.1172/JCI34584.
13. Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM, Brown GD. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem*. 2008;283:16693–16701. doi: 10.1074/jbc.M709923200.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

14. Silvestre JS, Théry C, Hamard G, *et al*. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med*. 2005;11:499–506. doi: 10.1038/nm1233.
15. Taleb S, Romain M, Ramkhelawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, Esposito B, Perez N, Yasukawa H, Van Snick J, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med*. 2009;206:2067–2077. doi: 10.1084/jem.20090545.
16. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, Huang J, Offenstadt G, Combadière C, Rénia L, Johnson JL, Tharaux PL, Tedgui A, Mallat Z. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422–432. doi: 10.1172/JCI38136.
17. Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F, *et al*. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*. 2008;112:3264–3273. doi: 10.1182/blood-2008-05-155176.
18. 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. doi: 10.1172/JCI7272.
19. Bronte V, Pittet MJ. The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013;39:806–818. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.010.
20. Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, Nagata S. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science*. 2004;304:1147–1150. doi: 10.1126/science.1094359.
21. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, *et al*. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2007;115:2168–2177. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.662080.
22. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 2006;86:515–581. doi: 10.1152/physrev.00024.2005.
23. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1342–1350. doi: 10.1172/JCI18607.
24. Gojova A, Brun V, Esposito B, Cottrez F, Gourdy P, Ardouin P, Tedgui A, Mallat Z, Groux H. Specific abrogation of transforming growth factor-beta signaling in T cells alters atherosclerotic lesion size and composition in mice. *Blood*. 2003;102:4052–4058. doi: 10.1182/blood-2003-05-1729.
25. Mallat Z, Besnard S, Duriez M, Deleuze V, Emmanuel F, Bureau MF, Soubrier F, Esposito B, Duez H, Fievet C, Staels B, Duverger N, Scherman D, Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;85:e17–e24.
26. Pinderski LJ, Fischbein MP, Subbanagounder G, Fishbein MC, Kubo N, Cheroutre H, Curtiss LK, Berliner JA, Boisvert WA. Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes. *Circ Res*. 2002;90:1064–1071.
27. Potteaux S, Esposito B, van Oostrom O, Brun V, Ardouin P, Groux H, Tedgui A, Mallat Z. Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1474–1478. doi: 10.1161/01.ATV.0000134378.86443.cd.
28. Choi JH, Cheong C, Dandamudi DB, Park CG, Rodriguez A, Mehandru S, Velinzon K, Jung IH, Yoo JY, Oh GT, Steinman RM. Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis. *Immunity*. 2011;35:819–831. doi: 10.1016/j.immuni.2011.09.014.
29. Legein B, Janssen EM, Theelen TL, *et al*. Ablation of CD8α(+) dendritic cell mediated cross-presentation does not impact atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Sci Rep*. 2015;5:15414. doi: 10.1038/srep15414.
30. Zelenay S, Keller AM, Whitney PG, Schraml BU, Deddouche S, Rogers NC, Schulz O, Sancho D, Reis e Sousa C. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest*. 2012;122:1615–1627. doi: 10.1172/JCI60644.
31. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997;389:737–742. doi: 10.1038/39614.
32. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity*. 2003;18:605–617.
33. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341–355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
34. Clément M, Basatemur G, Masters L, Baker L, Bruneval P, Iwawaki T, Kneilling M, Yamasaki S, Goodall J, Mallat Z. Necrotic cell sensor Clec4e promotes a proatherogenic macrophage phenotype through activation of the unfolded protein response. *Circulation*. 2016;134:1039–1051. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022668.
35. Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, Bressan J, Hermsdorff HH. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*. 2016;244:211–215. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015.
36. Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001;108:251–259. doi: 10.1172/JCI11380.
37. Dansky HM, Charlton SA, Harper MM, Smith JD. T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4642–4646.
38. Tsaousi A, Hayes EM, Di Gregoli K, Bond AR, Bevan L, Thomas AC, Newby AC. Plaque size is decreased but M1 macrophage polarization and rupture related metalloproteinase expression are maintained after deleting T-bet in apoE null mice. *PLoS One*. 2016;11:e0148873. doi: 10.1371/journal.pone.0148873.
39. Schraml BU, van Blijswijk J, Zelenay S, Whitney PG, Filby A, Acton SE, Rogers NC, Moncaut N, Carvajal JJ, Reis e Sousa C. Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell*. 2013;154:843–858. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.014.
40. Hanč P, Fujii T, Iborra S, Yamada Y, Huotari J, Schulz O, Ahrens S, Kjær S, Way M, Sancho D, Namba K, Reis e Sousa C. Structure of the complex of F-actin and DNGR-1, a C-type lectin receptor involved in dendritic cell cross-presentation of dead cell-associated antigens. *Immunity*. 2015;42:839–849. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.009.
41. Elhage R, Gourdy P, Brouchet L, Jawien J, Fouque MJ, Fiévet C, Huc X, Barreira Y, Couloumiers JC, Arnal JF, Bayard F. Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2004;165:2013–2018.
42. Kolbus D, Ljungcrantz I, Söderberg I, Alm R, Björkbacka H, Nilsson J, Fredrikson GN. TAP1-deficiency does not alter atherosclerosis development in Apoe-/- mice. *PLoS One*. 2012;7:e33932. doi: 10.1371/journal.pone.0033932.
43. Cochain C, Koch M, Chaudhari SM, Busch M, Pelisek J, Boon L, Zernecke A. CD8+ T cells regulate monopoiesis and circulating Ly6C-high monocyte levels in atherosclerosis in mice. *Circ Res*. 2015;117:244–253. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.304611.
44. Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, Boullier A, Almazan F, Li AC, Witztum JL, Bae YS, Miller YI. Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ Res*. 2009;104:1355–1363. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192880.
45. Yin H, Zhou H, Kang Y, Zhang X, Duan X, Alnabhan R, Liang S, Scott DA, Lamont RJ, Shang J, Wang H. Syk negatively regulates TLR4-mediated IFNβ and IL-10 production and promotes inflammatory responses in dendritic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860:588–598. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.12.012.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

Circulation Research
JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart Association®

The Dendritic Cell Receptor DNGR-1 Promotes the Development of Atherosclerosis in Mice

Yacine Haddad, Charlotte Lahoute, Marc Clément, Ludivine Laurans, Sarvenaz Metghalchi, Lynda Zeboudj, Andreas Giraud, Xavier Loyer, Marie Vandestienne, Julien Wain-Hobson, Bruno Esposito, Stephane Potteaux, Hafid Ait-Oufella, Alain Tedgui, Ziad Mallat and Soraya Taleb

Circ Res. 2017;121:234-243; originally published online June 12, 2017;
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310960
Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2017 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://circres.ahajournals.org/content/121/3/234

Data Supplement (unedited) at:
http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2017/06/12/CIRCRESAHA.117.310960.DC1

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

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

Subscriptions: Information about subscribing to *Circulation Research* is online at:
http://circres.ahajournals.org//subscriptions/

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on August 15, 2017

Supplemental Material

Extent and plaque composition of atherosclerotic lesions

Mice were anesthetized with isoflurane before sacrifice. Plasma cholesterol was measured using a commercial cholesterol kit (Sigma). The heart and aorta, including the brachiocephalic artery, were taken off, fixed in 4% paraformaldehyde for 2 hours. Lesion extent in the thoracic aorta represents the percentage of Oil red O staining. Necrotic cores were visualized using Masson's Trichrome. The presence of macrophages and T cells within plaques were studied using respectively an anti-monocytes/macrophages antibody, MOMA-2 (EMD Millipore) and anti-CD3 (DAKO, Trappes, France). At least 4 sections per mouse were examined for each immunostaining, and appropriate negative controls were used. Terminal dUTP nick end-labeling (TUNEL; ApopDETEK kit, ENZO Diagnostics, DAKO) was considered as positive when at least 2 of 6 sections per mouse showed TUNEL staining. We performed morphometric studies using Histolab software (Microvisions).

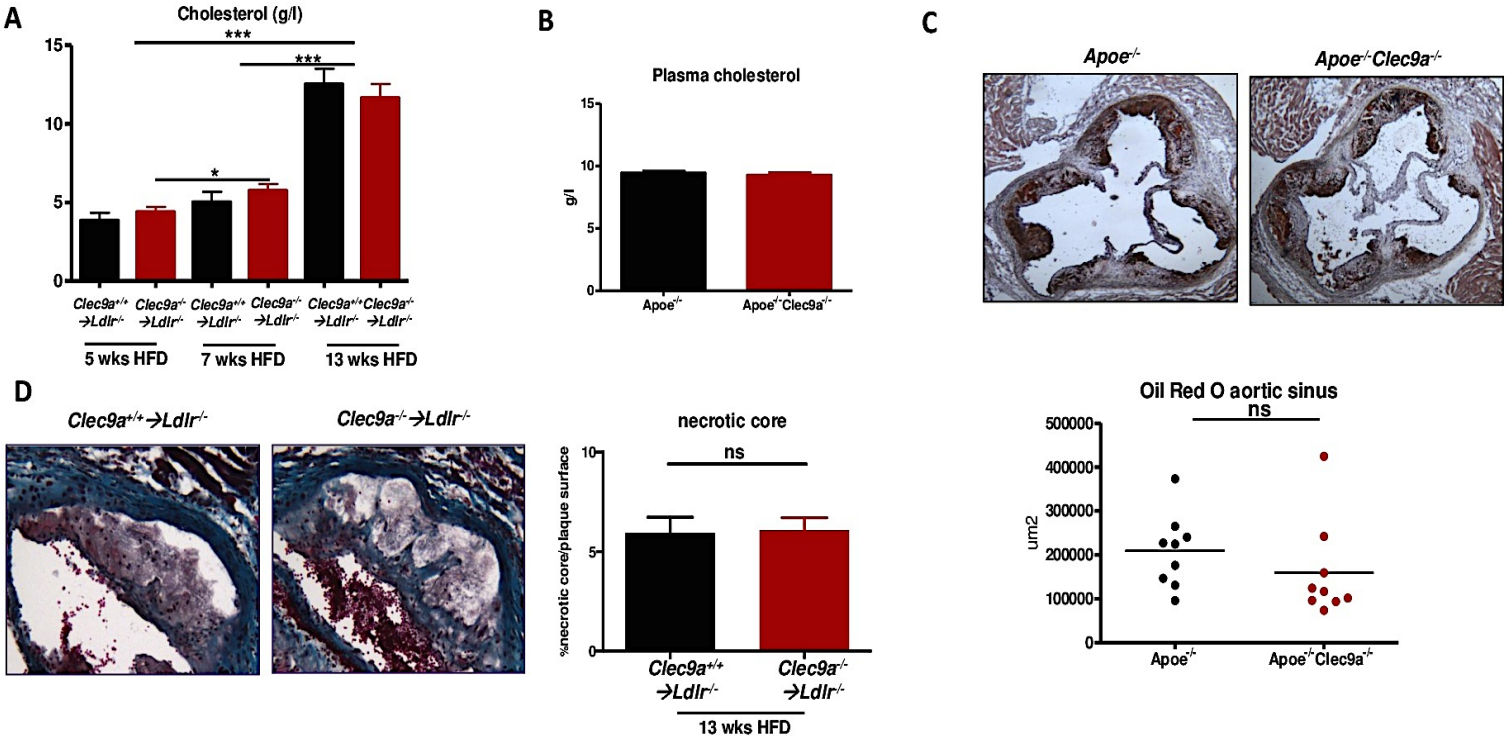
Quantitative Real time PCR

Cells were lysed in detergent buffer RLT and spleens were lysed in Trizol and then subjected to RNA extraction and reverse transcription (Qiagen). Then, quantitative real-time PCR was performed on an ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) in triplicates. Cycle threshold for *Gapdh* (primers: *Gapdh*-R, 5′-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3′; *Gapdh*-L, 5′-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3′) was used to normalize gene expression. Primers for *Il10, Clec9a, Tgfβ, Il6, Ifnγ and Il1β* are respectively: *Il10* (primers: *Il10*-R, 5′-AAGTGATGCCCCAGGCA -3′, *Il10*-L 5′- TCTCACCCAGGGAATTCAAA -3′), *Clec9a* (primers: *Clec9a*-R, 5'-*TTTGCACCAATCACAGCACAG-3'; Clec9a*-L, *5'-TGTGACTGCTCCCACAACTGG-3'), *Tgfβ* (primers: *Tgf-β*-R: 5'CGGAGAGCCCTGGATACCAACTA-3';*Tgfb*-L, 5'-CCGCACACAGCAGTTCTTCTCT-3'), *Il6* (primers *Il6*-R: 5'–GGTCTTGGTCCTTAGCCACTCCTTCTG T-3'; *Il6*-L, 5'-AAAGACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT-3'), *Ifnγ (primers Ifn-γ-R, 5'-AGCAACAGCAAGGCGAAAA -3'; Ifnγ-L, 5'- CTGGACCTGTGGGTTGTTGA -3'), Il1b* (primers *Il1β*-R*:* 5'- GGGTGTGCCGTCTTTCATTA -3'; *Il1β*-L: 5'- GAAGAGCCCATCCTCTGTGA - 3').

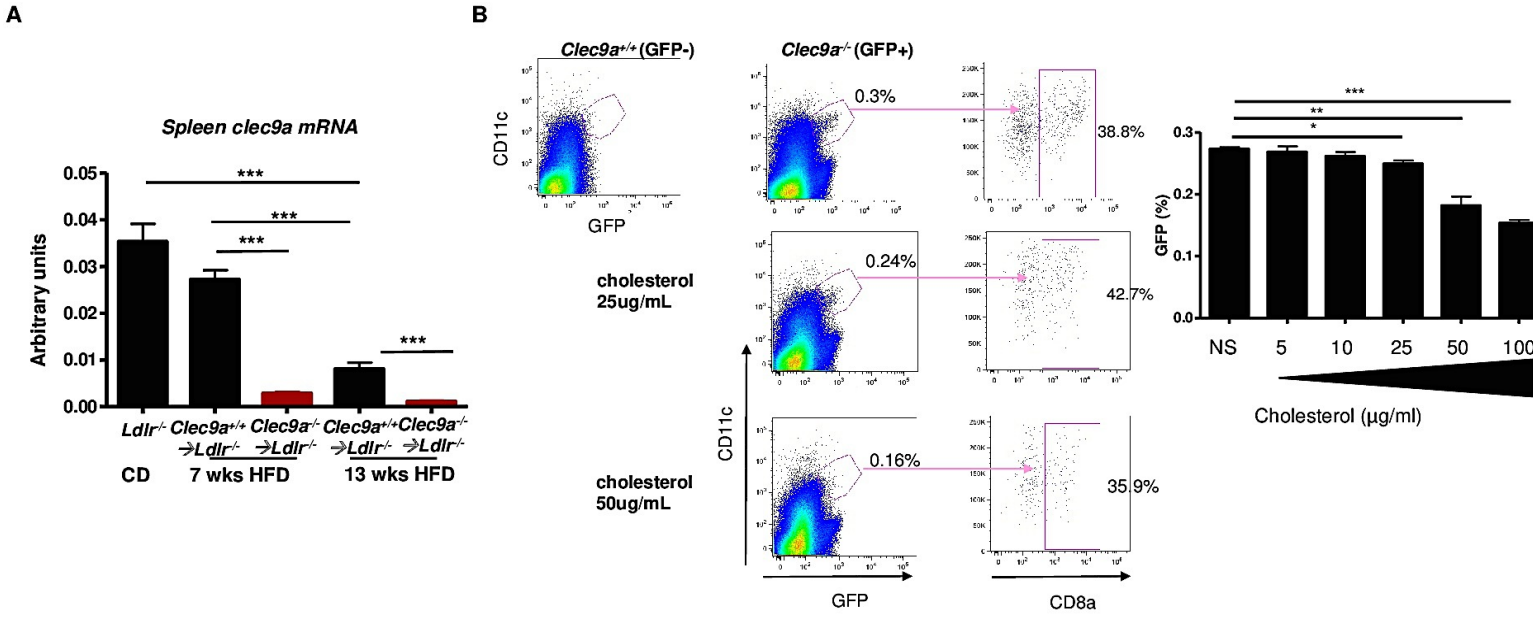
PCR conditions were 10 min at 95°C; 35 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 20 s; and a final extension at 72°C for 20s.

Flow cytometry

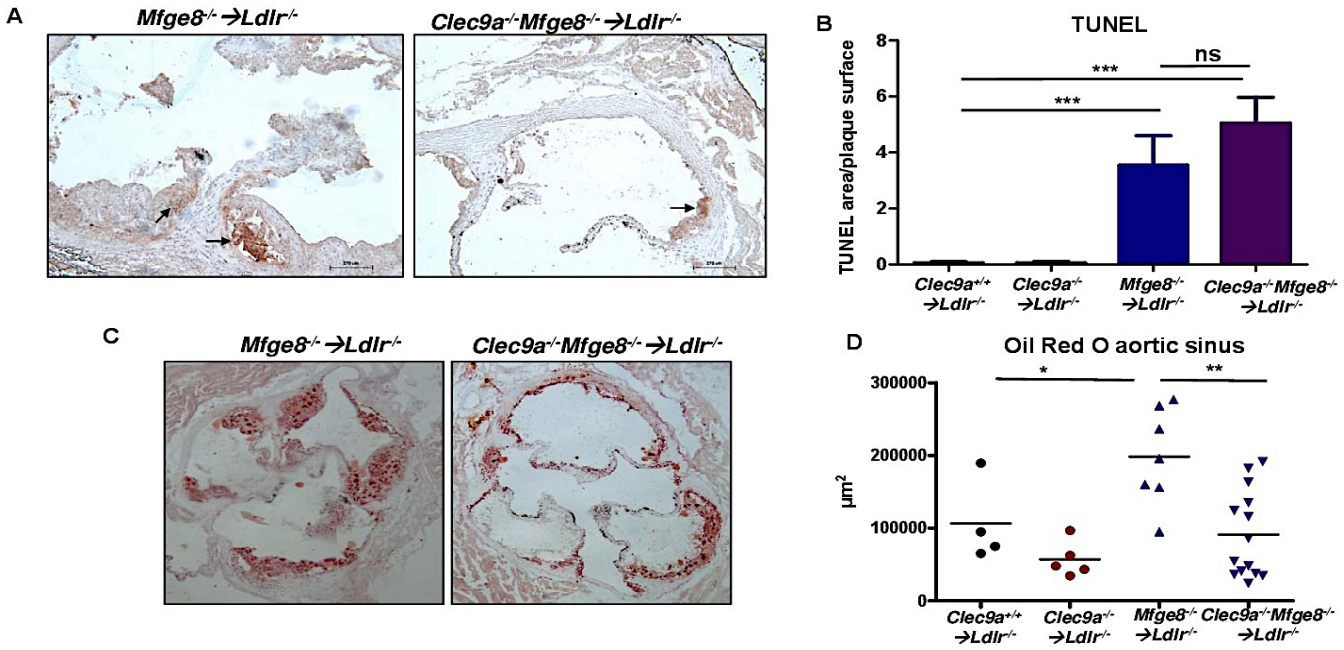
Cell surface staining are the following: APC-conjugated CD45.1 (A20), FITC-conjugated CD45.2 (104), PE-Cy7 conjugated CD11c (HL3), Alexa fluor 700-conjugated CD8 (53-6.7), PE-conjugated F4/80 (BM8) (BD Biosciences), and eFluor 450-conjugated CD62L (clone MEL-14), APC-conjugated CD44 (IM7) (eBiosciences), PercP-Cy5.5-conjugated GR-1 (RB6-8C5), APC-conjugated CD25 (PC61.5) (eBiosciences), and V-500-conjugated B220 (RA3-6B2). Intracellular staining of forkhead box P3 (PE-Cy7-conjugated FOXP3) (FJK-16s) (eBiosciences) was performed. Splenocytes were stimulated *in vitro* for 4 h using leukocyte activation cocktail (BD) for intracellular staining. Briefly, cells were stained for surface markers followed by fixation and permeabilization using a kit (eBiosciences) for intracellular staining. Then, cells were stained with APC-conjugated Il10 (clone JES5-16E3) (eBiosciences). For CD8α$^+$DCs staining, we used anti-CD11c-PE-Cy7 (clone: N418, Biolegend), MHC II Pacific blue (clone: M5/114.15.2, Biolegend), CD8a BV786 (clone: 53-6.7, Biolegend) and CD11b A700 (clone: M1/70, BDBiosciences).
Samples were acquired using a flow cytometer (LSRFortessa, Becton Dickinson) and data was analyzed using FlowJo software (TreeStar, OR, USA). Cell doublets were excluded using forward (FSC) and side (SSC) light scattering area (A) vs. width (W).



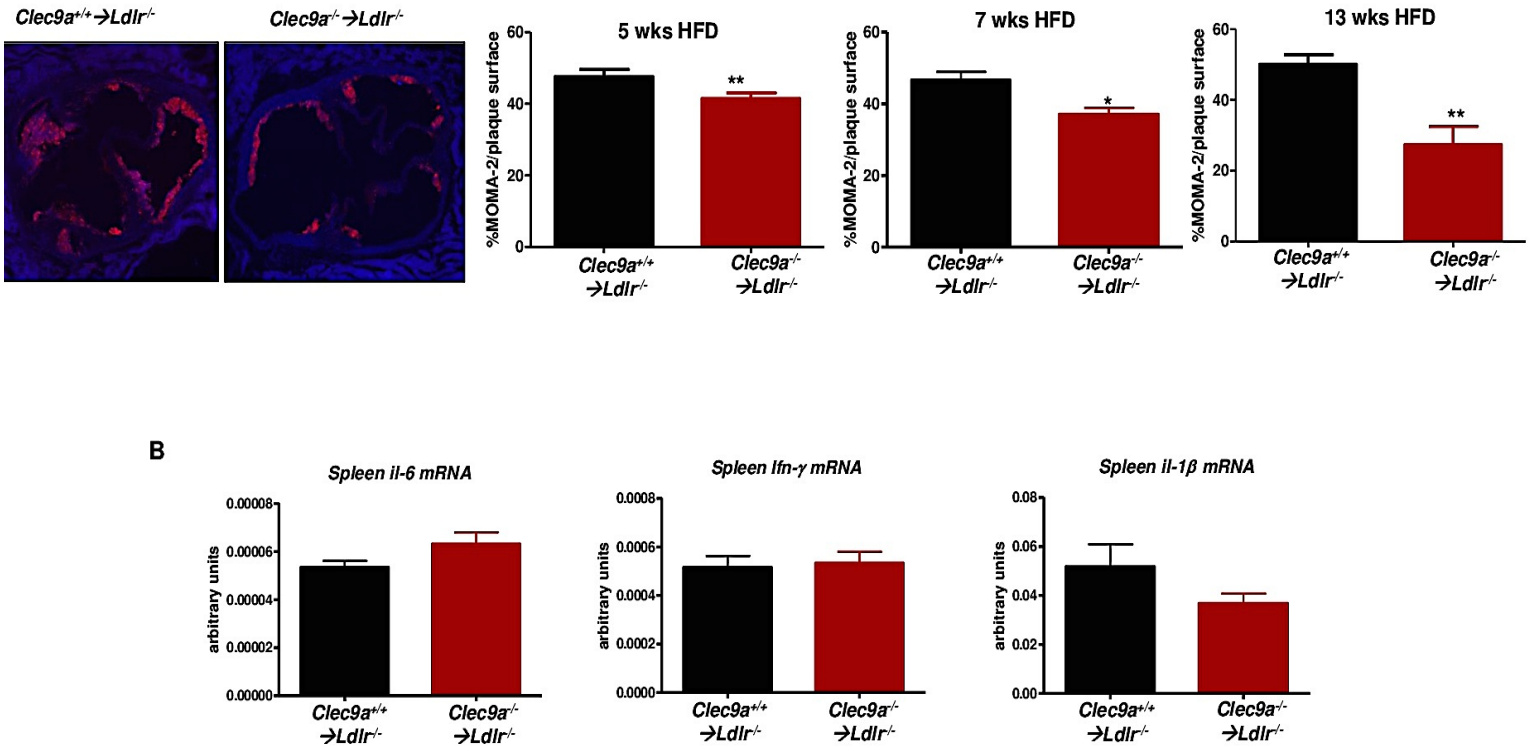
upplementary Figure I DNGR1 deletion effects in atherosclerosis. A plasma cholesterol in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control (*Clec9a*$^{+/+}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) or *Clec9a*$^{-/-}$ *Clec9a*$^{-/-}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) bone marrow after 5 weeks (control (n=7) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8)) or 7 weeks (control (n=12) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=16)) or 13 weeks (control (n=8) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9)) o igh fat diet (HFD). **B** plasma cholesterol **C** representative pictures and quantification of plaque size in aortic sinus of Apoe$^{-/-}$ (n=9) and Apoe$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$ (n=9) mice fed with HFD uring 6 weeks **D** representative pictures and quantification of necrotic cores in plaques of *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either (control (n=8) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9)) after 13 weeks of IFD. Mean values ± SEM are shown. *P<0.05, **P<0,001, ***P<0.0001.



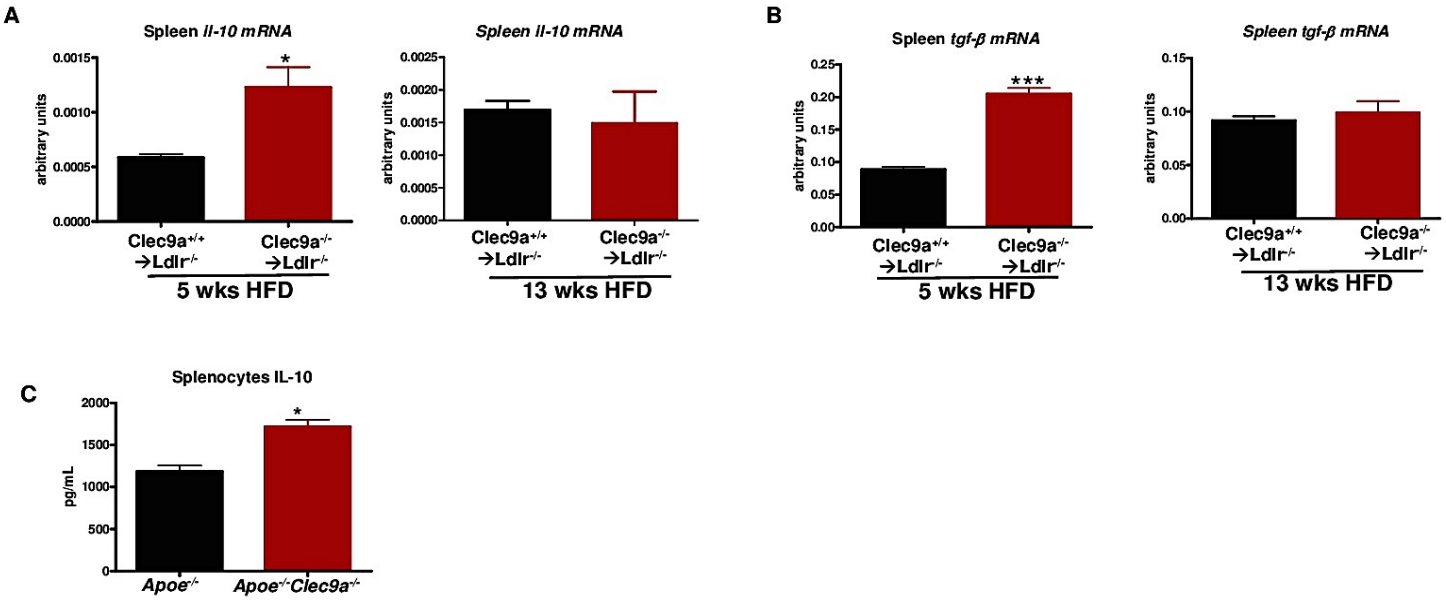
Supplementary Figure II High levels of cholesterol decreases DNGR1 expression. A *mRNA* expression of *Clec9a* in spleens of male *Ldlr*$^{-/-}$ mice on chow diet (CD) (n=3) or male *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control (*Clec9a*$^{+/+}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) or *Clec9a*$^{-/-}$ (*Clec9a*$^{-/-}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) bone marrow after 7 weeks (control (n=6) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8)) or 13 weeks control (n=7) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=7)) of high fat diet (HFD). **B** Representative examples and quantitative analysis of flow cytometry-based GFP expression in splenocytes from either control (*Clec9a*$^{+/+}$, GFP-) or *Clec9a*$^{-/-}$ (GFP+) (see materials and methods). Splenocytes were incubated in absence (NS) or in presence of cyclodextrin-cholesterol at different concentrations (5, 10, 25, 50, 100 ug/ml) during 16 h. One representative experiment out of two is shown. Mean values ± SEM are shown. * P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.



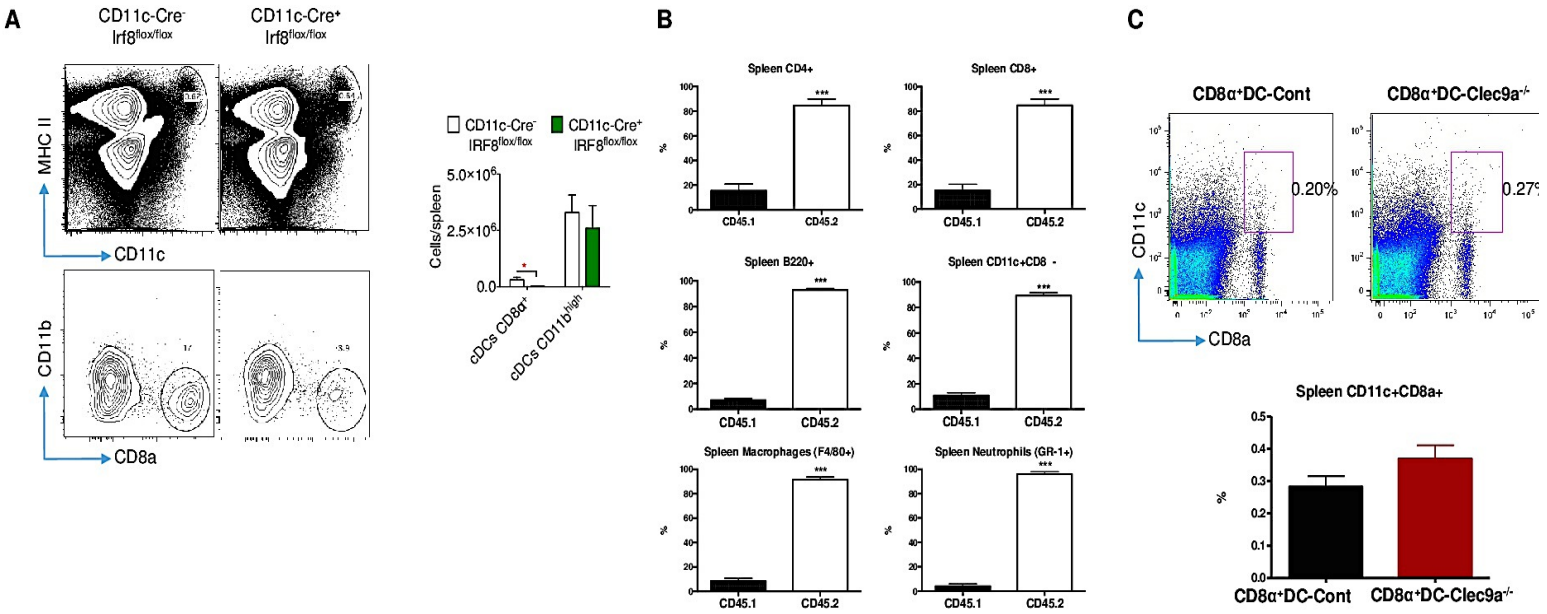
upplementary Figure III. DNGR1 deletion in bone marrow protects against atherosclerosis in mice bearing Mfge8 deletion with accumulation of apoptotic/necrotic ells. A-B Representative photomicrographs and quantifications of TUNEL staining in lethally-irradiated male *Ldlr*$^{-/-}$mice reconstituted with bone marrow from wild type control n=4) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=5) or *Mfge8*$^{-/-}$ (n=7) or *Mfge8*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ (n=15) mice. Percent lesion area occupied by acellular (apoptotic/necrotic) material are shown. Results were btained after 4 weeks of recovery from bone marrow transplantation followed by 7 weeks on a high fat diet (HFD). **C-D** Representative photomicrographs and quantification of esion size in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either Control (n=4) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=5) or *Mfge8*$^{-/-}$ (n=7) or *Mfge8*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ (n=15) bone marrow after 7 weeks of HFD. Results were btained after 4 weeks of recovery from bone marrow transplantation followed by 7 weeks on a HFD. Mean values ± SEM are shown. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.



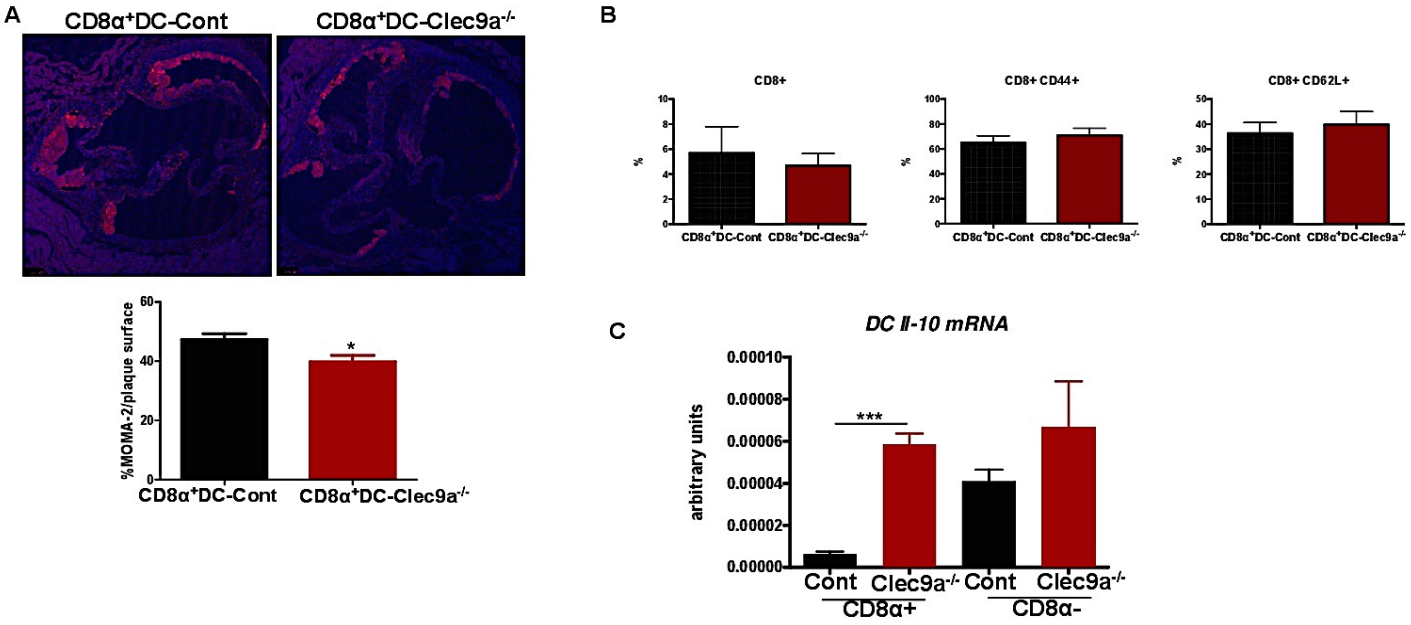
upplementary Figure IV DNGR1 effects on macrophage infiltration within plaques and on gene expression of inflammatory factors. **A** Representative hotomicrographs and quantitative analysis of lesional macrophage infiltration in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either Control (n=7) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8) after 5 weeks of high fat die HFD), or either Control (n=12) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=16) after 7 weeks of HFD, or either Control (n=8) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) after 13 weeks of HFD. **B** DNGR1 deletion has no effect on *mRNA* of *Il-6*, *Ifn-γ*, *Il-1β* in spleens of *Ldlr*$^{-/-}$ reconstituted with either control or *Clec9a*$^{-/-}$ bone marrow after 7 weeks of HFD. Mean values ± SEM are shown. *p<0.05,**P<0.001, ***P<0.0001.



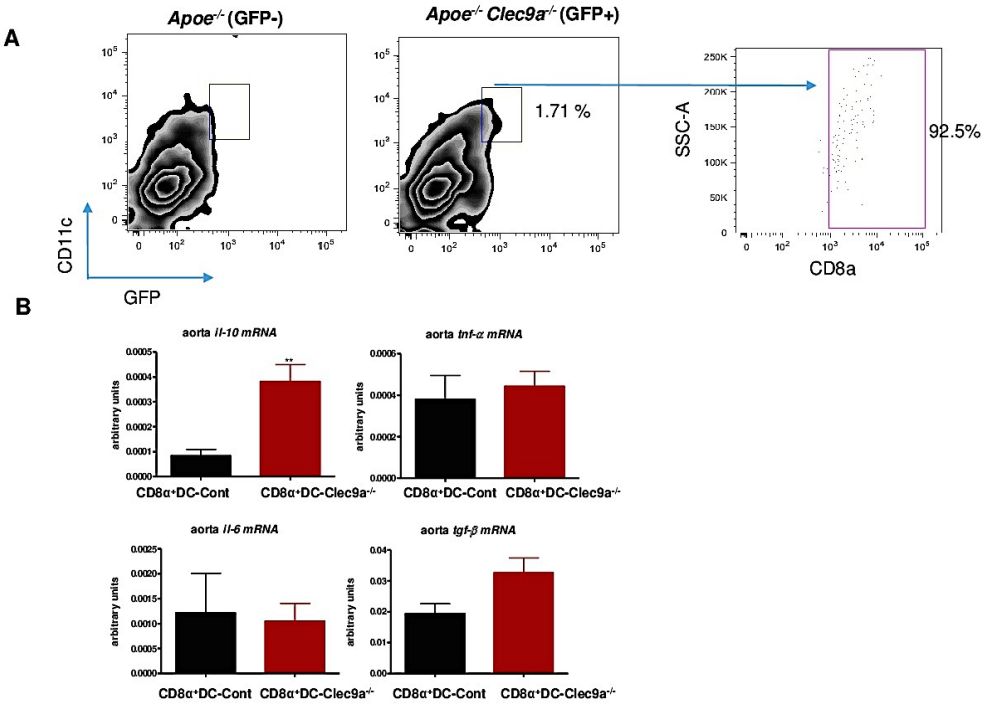
Supplementary Figure V DNGR1 deletion has anti-inflammatory effects at 5 weeks but not at 13 weeks of HFD. A-B DNGR1 deletion effects on *il-10* and *tgf-β mRNA* in spleens of *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control (*Clec9a*$^{+/+}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) or *Clec9a*$^{-/-}$ (*Clec9a*$^{-/-}$ → *Ldlr*$^{-/-}$) bone marrow after 5 weeks (control (n=7) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8)) or 13 weeks (control (n=8) and *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9)) of high fat diet (HFD). **C** DNGR1 deletion increases IL-10 production in supernatants of splenocytes from Apoe$^{-/-}$ (n=5) and Apoe$^{-/-}$Clec9a$^{-/-}$ (n=5) at 20 weeks-old after stimulation with LPS (1ug/ml) during 48 h. * P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.



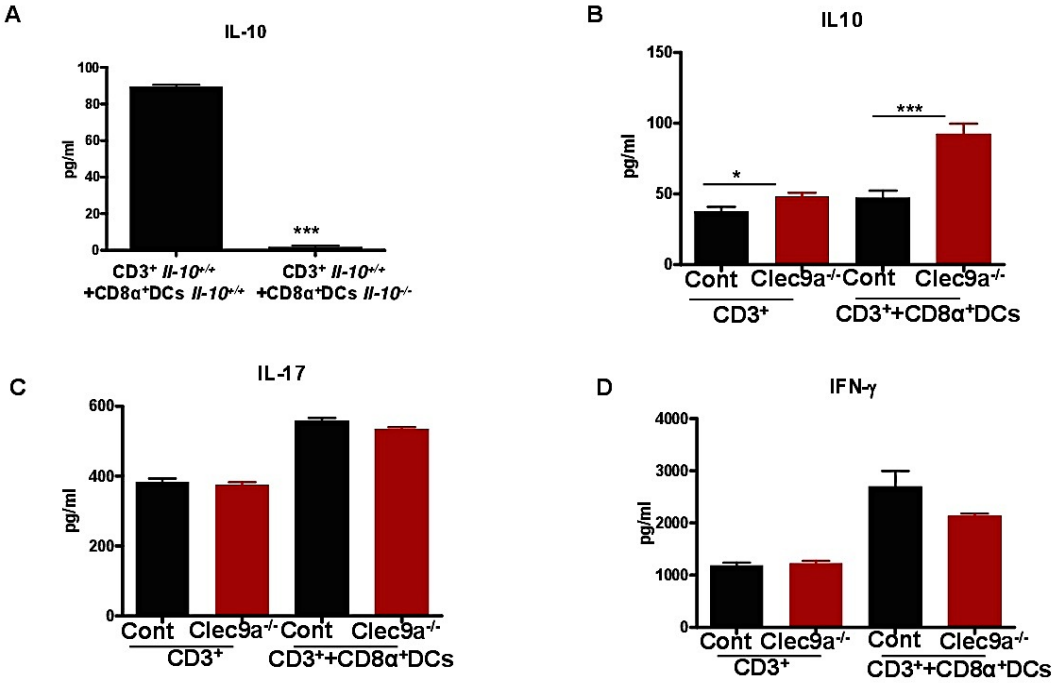
Supplementary Figure VI Constitution of control and Clec9a$^{-/-}$-CD8α^{+}DC chimeric mice . A Frequency of DCs (CD11c^{high}MHC II^{high}) and CD8a^{+}DCs in the spleen of *Cd11c^{Cre-}/Irf8$^{flox/flox}$* and *Cd11c^{Cre+}/Irf8$^{flox/flox}$* analysed by flow cytometry (n=3/group). **B** Donor origin as defined by flow cytometry analysis of CD45.1 % and CD45.2 % of different cell types in spleens of chimeric *Ldlr$^{-/-}$* mice transplanted with bone marrow mix (8:2) from *CD11c^{Cre+}/Irf8$^{flox/flox}$* (CD45.2) and control (CD45.1) mice (n=7). **C** representation and quantification of CD8α+DC by flow cytometry in control group (CD8α^{+}DC-Cont, n=7) or DNGR1-deficient CD8α^{+}DC group (CD8α^{+}DC-Clec9a$^{-/-}$, n=8) after 7 weeks of HFD. Mean values ± SEM are shown.***P<0.0001, *P≤0.05.



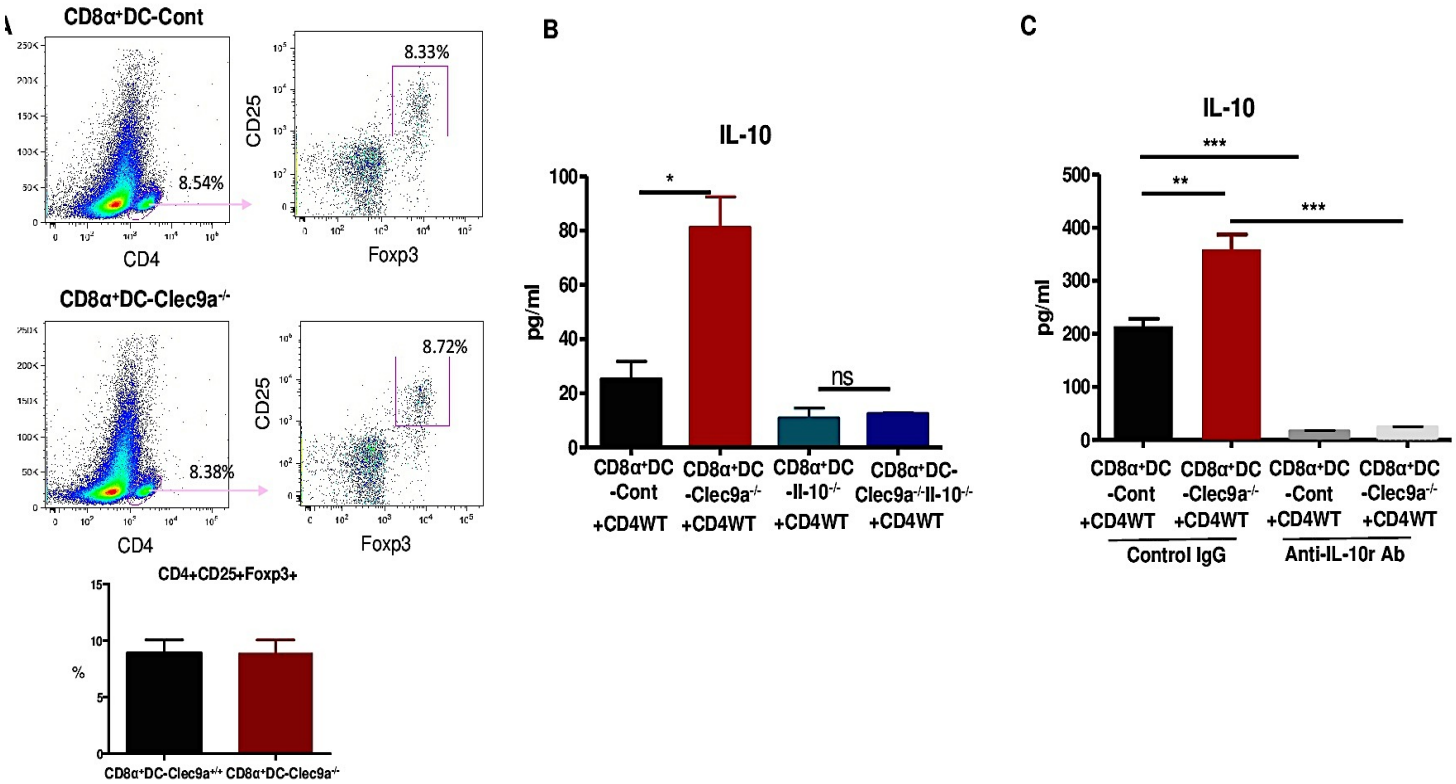
Supplementary Figure VII effects of DNGR1 deletion in CD8α+DCs. A photomicrographs and quantitative analysis of lesional macrophages in *Ldlr*$^{-/-}$ mice reconstituted with either control group (CD8α$^+$DC-Cont, n=7) or Clec9a-deficient CD8α$^+$DC group (CD8α$^+$DC-Clec9a$^{-/-}$, n=8) after 7 weeks of high fat diet (HFD) **B** No change in activated (CD44+) and naive (CD62L+) spleen CD8+ T cells in the Clec9a-deficient CD8α$^+$DCs (n=8) compared to control-CD8α$^+$DCs (n=7) groups of mice. **C** *Il-10 mRNA* in pooled Clec9a-deficient CD8α$^+$DCs (n=3) or CD8α$^-$DCs (n=3) compared to control-CD8α$^+$DCs (n=3) or CD8α$^-$DCs (n=3) isolated from chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with bone marrow mix (2:8) from control (CD45.1) (n=7) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=8) bone marrow cells mixed with *Cd11c*$^{Cre+}$*/Irf8*$^{flox/flox}$ (CD45.2) bone marrow. Mean values ± SEM are shown. *p<0.05, ***<0.0001.



upplementary Figure VIII DNGR1 deletion in CD8α⁺DCs increases Il-10 expression in aorta. A Representative examples of flow cytometry-based GFP expression in purifie D45 cells from aorta of either control (*Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{+/+}$, GFP-) or *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ (GFP+) (see materials and methods). **B** mRNA of *il10*, *tnfα*, *il6* and *tgfβ* in aorta from the DNGR eficient CD8α⁺DCs (n=8) compared to control-CD8α⁺DCs (n=7) groups of mice. Mean values ± SEM are shown. **P<0.001.



Supplementary Figure IX DNGR1 deletion in CD8α⁺DCs increases IL-10 production by T cells.. **A** IL-10 production by anti-CD3 (5ug/ml) and anti-CD28 (1 ug/ml) stimulated spleen TCD3+ cells from *Il-10*$^{+/+}$ mice, co-cultured in presence of LPS (1ug/ml)-treated spleen CD8α⁺DCs from *Il-10*$^{+/+}$ or *Il-10*$^{-/-}$ mice, measured after 48 h of stimulation. **B-D** IL-10, Il-17 and IFN-γ production by anti-CD3 (5ug/ml) and anti-CD28 (1 ug/ml) stimulated spleen CD3+ cells from *Apoe*$^{-/-}$ mice (n=3) or *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ mice (n=3), co-cultured in presence of LPS (1ug/ml)-treated spleen CD8α⁺DCs from *Apoe*$^{-/-}$ mice (n=3) or *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ mice (n=3), measured after 48 h of stimulation. Both CD8α⁺DCs and T cells were isolated from *Apoe*$^{-/-}$ mice (n=3) or *Apoe*$^{-/-}$*Clec9a*$^{-/-}$ mice (n=3) after 20 weeks of chow diet . Mean values ± SEM are shown. *p<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.



Supplementary Figure X DNGR1 deletion in CD8α+DCs increases IL-10 production by T cells.. **A** Representative and quantification by flow cytometry of regulatory T cell CD4+CD25+FOXP3+) **B** IL-10 production by anti-CD3 (5ug/ml) and anti-CD28 (1 ug/ml) stimulated spleen CD4+ cells from wild-type (WT) mice, co-cultured in presence of LPS (1ug/ml)-treated spleen CD8α+DCs from chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with 2:8 mix of bone marrow from control (n=8) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) or *Il-10*$^{-/-}$ (n=8) or *Clec9a*$^{-/-}$*Il-10*$^{-/-}$ (n=9) bone marrow cells mixed with *Cd11c*$^{Cre+}$/*Irf8*$^{flox/flox}$ bone marrow, after 7 wks of HFD and IL-10 was measured after 48 h of stimulation. **C** IL-10 production by anti-CD3 (5ug/ml) and anti-CD28 (1 ug/ml) stimulated spleen CD4+ cells from WT mice, co-cultured in presence of LPS (1ug/ml)-treated spleen CD8α+DCs from chimeric *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with 2:8 mix of bone marrow from control (n=8) or *Clec9a*$^{-/-}$ (n=9) in presence of control IgG or anti-IL-10 receptor neutralizing antibody (anti-IL-10r Ab, 10µg/ml). Mean values ± SEM are shown. *p<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

8.2 Liste des abréviations

Abréviations	Définitions
ABCA1	ATP-Binding Cassette, sub-family A, member 1
ABCG1	ATP-Binding Cassette, sub-family G, member 1
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigènes
AHA	American Heart Association
APAF-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
APC	Antigen-Presenting Cells (Cellules présentatrices d'antigènes professionnelles)
ApoE-/-	Apolipoprotéine E knockout
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BATF3	Basic leucine zipper ATF-like Transcription Factor 3
Bax	Bcl-2-associated X
Bcl-2	B cell lymphoma-2
BDCA2	Blood Dendritic Cell Antigen 2
BDCA3	Blood Dendritic Cell Antigen 3
Bid	BH3-Interacting-domain Death agonist
B-regs	B régulateurs
Calr	Calreticulin
CAM	Cell Adhesion Molecule
CCL	C-C Motif Chemokine Ligand
CD4	Cluster of Differentiation 4
cDC	conventional Dendritic Cells

CDP	Common-DC Progenitor
CE	Cellule Endothéliale
Chop	CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein
cIAP	cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins
Clec4e	C-type lectin domain family 4 member E
Clec9a	C-type lectin domain family 9 member A
CLR	C-type Lectin Receptor
CMH-I	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
CMH-II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
CML	Cellules Musculaires Lisses
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
CSF-1	Colony Stimulating Factor 1
CTLD	C-Type Lectin Domain
Cyld	Cylindromatosis
DAMPs	Damage-Associated Molecular Patterns
DAP12	DNAX Activating Protein of 12KDa
DC	Cellule Dendritique
DISC	Death-Inducing Signal Complex
DNGR-1	DC, NK-lectin Group Receptor-1
DT	Diphtheria Toxin
DTR	Diphtheria Toxin Receptor
EEA1	Early Endosomal Antigen 1
ESL-1	E-Selectine Ligand 1
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FC	Free Cholesterol

FcR☐	Fc Receptor gamma chain
FLT3-L	FMS-Like Tyrosine kinase 3 Ligand
FOXP3	Forkhead box P3
Gas6	Growth arrest specific 6
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HDL	High Density Lipoprotein (lipoprotéine de haute densité)
HSC	Hematopoietic Stem Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFNγ	Interferon Gamma
IgM	Immunoglobulines M
IL1-☐	Interleukin 1 beta
ILC	Innate Lymphoid Cells
ILDL	Intermediate Density Lipoprotein (lipoprotéines de densité intermédiaire)
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1
Ire1☐	Inositol-requiring protein 1 ☐
IRF	Interferon Regulatory Factor
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM	Immunoreceptor Tyosine-based Inhibitory Motif
iTreg	induced Treg
JAM	Junctional Adhesion Molecule
LB1	Lymphocytes B1
LB-IRA	Lymphocytes B-Innate Response Activator
LDL	Low Density Lipoprotein (lipoprotéines de faible densité)
LDLr-/-	Low Density Lipoprotein receptor

LFA-1	Lymphocyte Fonction-Associated Antigen-1
LOX-1	Lectin-like Oxidized low density lipoprotein receptor-1
LPC	Lysophosphatidylcholine
LRP1	Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1
LRR	Leucine Rich Repeat
LT	Lymphocyte T
LTc	Lymphocytes T cytotoxiques
LTfh	LT-CD4+ folliculaires
LXR	Liver X Receptor
Mac-1	Macrophage-1-Antigen
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chimoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEC	Matrice Extracellulaire
Mertk	Mertyrosine kinase
MFGE8	Milk Fat Globule-EGF factor 8, ou Lactaderin
MINCLE	Macrophage Inducible C-type Lectin
MLKL	Mixed Lineage Kinase domain-Like protein
mmLDL	minimally oxidized Low-Density Lipoprotein
MMP	Métalloprotéinases
MMP9	Matrix Metalloprotease-9
MYD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NEMO	NF-□B Essential Modulator
NF-□B	Nuclear Factor-kappa B
NLR	NOD Like Receptor

NLRP3	NLR Family Pyrin Domain Containing 3
NO	Monoxyde d'Azote
NOX2	NADPH Oxydase 2
nTreg	natural Treg
OLS	Organes Lymphoïdes Secondaires
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OxLDL	Oxidized Low-Density Lipoprotein
Pam3CSK4	N-palmitoyl-S-dipalmitoylglyceryl Cys-Ser-(Lys)4
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PARP1	Poly(ADP-Ribose) Polymérase 1
pDC	plasmacytoid Dendritic Cells
PDCA-1	Plasmacytoid Dendritic Cells Antigen-1
PECAM1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PGSL-1	P-Selectine Glycoprotein Ligand 1
pMLKL	Phosphorylation de MLKL
PRR	Pattern Recognition Receptor
Rab	Ras-related protein
Rag2-/-	Recombination-activating genes 2 knock out
RE	Reticulum Endoplasmique
RIPK1	Receptor Interacting serine-threonine Protein Kinase 1
RLR	RIG-I Like Receptors
RORγt	Retinoid-related Orphan Receptor γt
ROS	Reactive Oxygen Species
SRA	Scavenger Receptor type A
SRB	Scavenger Receptor type B

STAT-3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SYK	Spleen tyrosine Kinase
SYK/CARD9	Spleen tyrosine kinase/Caspase Recruitment Domain-containing protein 9
TAB	TAK-Binding protein 1
TAK1	TGF-□-Activated Kinase 1
TAP	Transporter associated with Antigen Processing
T-bet	T-box transcription factor
Tcf4/E2-2	helix-loop-helix Transcription factor (E protein)
TCR	T Cell Receptor
TDB	Trehalose-6, 6'-Dibehenate
TGF□	Transforming Growth Factor beta
Th	T helper
TIR	Toll /Interleukine-l Receptor
TLR	Toll-Like Receptor
TNFα	Tumor Necrosis Factor alpha
TRAF6	TNFα receptor associated factor6
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon-□
UPR	Unfolded Protein Response
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA-4	Very Late Antigen-4 a4b1 Integrin
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (lipoprotéines de très faible densité)
Xbp1	X-box binding protein 1

8.3 Bibliographie

1. Murray, C.J. and A.D. Lopez, *Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study.* Lancet, 1997. **349**(9064): p. 1498-504.
2. Writing Group, M., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association.* Circulation, 2016. **133**(4): p. e38-360.
3. Scott, R.A., S.G. Bridgewater, and H.A. Ashton, *Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women.* Br J Surg, 2002. **89**(3): p. 283-5.
4. Gordon, T., et al., *Menopause and coronary heart disease. The Framingham Study.* Ann Intern Med, 1978. **89**(2): p. 157-61.
5. Brown, L.C. and J.T. Powell, *Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants.* Ann Surg, 1999. **230**(3): p. 289-96; discussion 296-7.
6. Bayard, F., et al., *Estrogens and atherosclerosis.* Ernst Schering Res Found Workshop, 2004(46): p. 181-7.
7. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study.* Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-52.
8. Gyarfas, I., M. Keltai, and Y. Salim, *[Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries in a case-control study based on the INTERHEART study].* Orv Hetil, 2006. **147**(15): p. 675-86.
9. Abdelfattah, A., et al., *Atherosclerotic cardiovascular disease in Egyptian women: 1570 BCE-2011 CE.* Int J Cardiol, 2013. **167**(2): p. 570-4.
10. 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.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(9): p. 1512-31.
11. 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. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.

12. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E.* Science, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
13. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells.* Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
14. Reddick, R.L., S.H. Zhang, and N. Maeda, *Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(1): p. 141-7.
15. Tous, M., et al., *Dietary cholesterol and differential monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in aorta and liver of apo E-deficient mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **340**(4): p. 1078-84.
16. Ishibashi, S., et al., *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery.* J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 883-93.
17. Ishibashi, S., et al., *Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice.* J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1885-93.
18. Chiu, J.J. and S. Chien, *Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives.* Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 327-87.
19. Malek, A.M., S.L. Alper, and S. Izumo, *Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis.* JAMA, 1999. **282**(21): p. 2035-42.
20. Napoli, C., *Low density lipoprotein oxidation and atherogenesis: from experimental models to clinical studies.* G Ital Cardiol, 1997. **27**(12): p. 1302-14.
21. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
22. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies.* Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
23. Takei, A., Y. Huang, and M.F. Lopes-Virella, *Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein. Influences of*

degree of oxidation and location of oxidized LDL. Atherosclerosis, 2001. **154**(1): p. 79-86.

24. Topper, J.N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype.* Mol Med Today, 1999. **5**(1): p. 40-6.
25. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis.* J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.
26. Collins, R.G., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 189-94.
27. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.* Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
28. Kitagawa, K., et al., *Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in APOE-knockout mice.* Atherosclerosis, 2002. **160**(2): p. 305-10.
29. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.* J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1255-62.
30. Gupta, S., et al., *IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice.* J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2752-61.
31. Deguchi, J.O., et al., *Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques.* Circulation, 2005. **112**(17): p. 2708-15.
32. Gough, P.J., et al., *Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice.* J Clin Invest, 2006. **116**(1): p. 59-69.
33. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties.* Immunity, 2003. **19**(1): p. 71-82.
34. Hristov, M. and G.H. Heine, *Monocyte subsets in atherosclerosis.* Hamostaseologie, 2015. **35**(2): p. 105-12.
35. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 185-94.
36. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 195-205.

37. Combadiere, C., et al., *Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice.* Circulation, 2008. **117**(13): p. 1649-57.
38. Belge, K.U., et al., *The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF.* J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3536-42.
39. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.* J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
40. Randolph, G.J., et al., *The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting.* J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 517-27.
41. Rekhter, M.D. and D. Gordon, *Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques.* Am J Pathol, 1995. **147**(3): p. 668-77.
42. Johnson, J.L. and A.C. Newby, *Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques.* Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(5): p. 370-8.
43. Potteaux, S., et al., *Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe-/- mice during disease regression.* J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 2025-36.
44. Saederup, N., et al., *Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2-/- mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis.* Circulation, 2008. **117**(13): p. 1642-8.
45. Robbins, C.S., et al., *Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis.* Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1166-72.
46. Ensan, S., et al., *Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth.* Nat Immunol, 2016. **17**(2): p. 159-68.
47. Childs, B.G., et al., *Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis.* Science, 2016. **354**(6311): p. 472-477.
48. Lhotak, S., et al., *Characterization of Proliferating Lesion-Resident Cells During All Stages of Atherosclerotic Growth.* J Am Heart Assoc, 2016. **5**(8).

49. Andreeva, E.R., I.M. Pugach, and A.N. Orekhov, *Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro.* Atherosclerosis, 1997. **135**(1): p. 19-27.
50. Chappell, J., et al., *Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models.* Circ Res, 2016. **119**(12): p. 1313-1323.
51. Feil, S., et al., *Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis.* Circ Res, 2014. **115**(7): p. 662-7.
52. Shankman, L.S., et al., *KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis.* Nat Med, 2015. **21**(6): p. 628-37.
53. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13531-6.
54. Vengrenyuk, Y., et al., *Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(3): p. 535-46.
55. Tabas, I., *Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages.* Biochim Biophys Acta, 2000. **1529**(1-3): p. 164-74.
56. Yvan-Charvet, L., et al., *Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice.* J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3900-8.
57. Yvan-Charvet, L., et al., *Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions.* Circulation, 2008. **118**(18): p. 1837-47.
58. Kzhyshkowska, J., C. Neyen, and S. Gordon, *Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis.* Immunobiology, 2012. **217**(5): p. 492-502.
59. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.* J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1049-56.

60. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection.* Nature, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
61. Febbraio, M., E. Guy, and R.L. Silverstein, *Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(12): p. 2333-8.
62. Moore, K.J., et al., *Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice.* J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2192-201.
63. Mallat, Z., et al., *Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability.* Circulation, 2001. **104**(14): p. 1598-603.
64. Ohta, H., et al., *Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.* Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 11-7.
65. Lee, T.S., et al., *The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 734-42.
66. Whitman, S.C., P. Ravisankar, and A. Daugherty, *Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma.* Circ Res, 2002. **90**(2): p. E34-8.
67. Pineda-Torra, I., et al., *Isolation, Culture, and Polarization of Murine Bone Marrow-Derived and Peritoneal Macrophages.* Methods Mol Biol, 2015. **1339**: p. 101-9.
68. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation.* J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
69. Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin, and B. Staels, *Macrophage subsets in atherosclerosis.* Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(1): p. 10-7.
70. Anderson, C.F., J.S. Gerber, and D.M. Mosser, *Modulating macrophage function with IgG immune complexes.* J Endotoxin Res, 2002. **8**(6): p. 477-81.
71. Finn, A.V., et al., *Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(2): p. 166-77.
72. Boyle, J.J., et al., *Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection.* Circ Res, 2012. **110**(1): p. 20-33.

73. Kadl, A., et al., *Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2.* Circ Res, 2010. **107**(6): p. 737-46.
74. Gleissner, C.A., et al., *CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages.* J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4810-8.
75. Schraml, B.U. and C. Reis e Sousa, *Defining dendritic cells.* Curr Opin Immunol, 2015. **32**: p. 13-20.
76. Waskow, C., et al., *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues.* Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 676-83.
77. Greter, M., et al., *GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells.* Immunity, 2012. **36**(6): p. 1031-46.
78. Kopp, E. and R. Medzhitov, *Recognition of microbial infection by Toll-like receptors.* Curr Opin Immunol, 2003. **15**(4): p. 396-401.
79. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
80. Romani, N., et al., *Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells.* J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 1169-78.
81. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
82. Carreno, B.M. and M. Collins, *The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 29-53.
83. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.* Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 659-68.
84. Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio, *Selection of regulatory T cells in the thymus.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(3): p. 157-67.
85. Mathis, D. and C. Benoist, *Back to central tolerance.* Immunity, 2004. **20**(5): p. 509-16.
86. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 833-44.

87. Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 351-8.
88. Morelli, A.E., H. Hackstein, and A.W. Thomson, *Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation.* Semin Immunol, 2001. **13**(5): p. 323-35.
89. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
90. Choi, J.H., et al., *Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves.* J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 497-505.
91. Yilmaz, A., et al., *Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques.* Atherosclerosis, 2004. **176**(1): p. 101-10.
92. Gautier, E.L., et al., *Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis.* Circulation, 2009. **119**(17): p. 2367-75.
93. Buono, C., et al., *B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice.* Circulation, 2004. **109**(16): p. 2009-15.
94. Sun, J., et al., *Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice.* Circulation, 2010. **122**(8): p. 808-20.
95. Choi, J.H., et al., *Flt3 signaling-dependent dendritic cells protect against atherosclerosis.* Immunity, 2011. **35**(5): p. 819-31.
96. 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. 416-29.
97. Cheong, C., et al., *New monoclonal anti-mouse DC-SIGN antibodies reactive with acetone-fixed cells.* J Immunol Methods, 2010. **360**(1-2): p. 66-75.
98. Jongstra-Bilen, J., et al., *Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis.* J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2073-83.
99. Niessner, A. and C.M. Weyand, *Dendritic cells in atherosclerotic disease.* Clin Immunol, 2010. **134**(1): p. 25-32.

100. Weber, C., et al., *CCL17-expressing dendritic cells drive atherosclerosis by restraining regulatory T cell homeostasis in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(7): p. 2898-910.
101. Medina-Contreras, O., et al., *CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(12): p. 4787-95.
102. Grassia, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: biomarkers or potential therapeutic targets in atherosclerosis?* Pharmacol Ther, 2013. **137**(2): p. 172-82.
103. Kretzschmar, D., et al., *Decrease in circulating dendritic cell precursors in patients with peripheral artery disease.* Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 450957.
104. Daissormont, I.T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells protect against atherosclerosis by tuning T-cell proliferation and activity.* Circ Res, 2011. **109**(12): p. 1387-95.
105. Doring, Y., et al., *Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis.* Circulation, 2012. **125**(13): p. 1673-83.
106. Rai, V., et al., *Dendritic Cells Expressing Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Correlate with Plaque Stability in Symptomatic and Asymptomatic Patients with Carotid Stenosis.* PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0154802.
107. Macritchie, N., et al., *Plasmacytoid dendritic cells play a key role in promoting atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2569-79.
108. Yun, T.J., et al., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Expressing Aortic Plasmacytoid Dendritic Cells Protect against Atherosclerosis by Induction of Regulatory T Cells.* Cell Metab, 2016. **23**(5): p. 852-66.
109. Hu, D., et al., *Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin beta Receptors.* Immunity, 2015. **42**(6): p. 1100-15.
110. Sage, A.P., et al., *MHC Class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells drives proatherogenic T cell immunity.* Circulation, 2014. **130**(16): p. 1363-73.
111. Swiecki, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual.* Immunity, 2010. **33**(6): p. 955-66.

112. Mandl, M., et al., *Evaluation of the BDCA2-DTR Transgenic Mouse Model in Chronic and Acute Inflammation.* PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0134176.
113. Wu, P., et al., *TLR9/TLR7-triggered downregulation of BDCA2 expression on human plasmacytoid dendritic cells from healthy individuals and lupus patients.* Clin Immunol, 2008. **129**(1): p. 40-8.
114. Maraskovsky, E., et al., *Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified.* J Exp Med, 1996. **184**(5): p. 1953-62.
115. Mackarehtschian, K., et al., *Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors.* Immunity, 1995. **3**(1): p. 147-61.
116. Busch, M., et al., *Dendritic cell subset distributions in the aorta in healthy and atherosclerotic mice.* PLoS One, 2014. **9**(2): p. e88452.
117. Legein, B., et al., *Ablation of CD8alpha(+) dendritic cell mediated cross-presentation does not impact atherosclerosis in hyperlipidemic mice.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 15414.
118. Gil-Pulido, J., et al., *Deletion of Batf3-dependent antigen-presenting cells does not affect atherosclerotic lesion formation in mice.* PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0181947.
119. Li, Y., et al., *Batf3-dependent CD8alpha+ Dendritic Cells Aggravates Atherosclerosis via Th1 Cell Induction and Enhanced CCL5 Expression in Plaque Macrophages.* EBioMedicine, 2017. **18**: p. 188-198.
120. Veillard, N.R., et al., *Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice.* Circ Res, 2004. **94**(2): p. 253-61.
121. Braunersreuther, V., et al., *A novel RANTES antagonist prevents progression of established atherosclerotic lesions in mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(6): p. 1090-6.
122. 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. 33-43.
123. Davenport, P. and P.G. Tipping, *The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 1117-25.

124. Elhage, R., et al., *Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(1): p. 234-40.
125. Whitman, S.C., et al., *Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice.* Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1819-24.
126. Barks, J.L., J.J. McQuillan, and M.F. Iademarco, *TNF-alpha and IL-4 synergistically increase vascular cell adhesion molecule-1 expression in cultured vascular smooth muscle cells.* J Immunol, 1997. **159**(9): p. 4532-8.
127. Winsor, G.L., et al., *Interleukin-4 and IFN-gamma differentially stimulate macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) and eotaxin production by intestinal epithelial cells.* J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(3): p. 299-308.
128. Cornicelli, J.A., et al., *Interleukin-4 augments acetylated LDL-induced cholesterol esterification in macrophages.* J Lipid Res, 2000. **41**(3): p. 376-83.
129. 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.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(3): p. 456-61.
130. Binder, C.J., et al., *IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis.* J Clin Invest, 2004. **114**(3): p. 427-37.
131. Cardilo-Reis, L., et al., *Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype.* EMBO Mol Med, 2012. **4**(10): p. 1072-86.
132. Engelbertsen, D., et al., *Expansion of CD25+ Innate Lymphoid Cells Reduces Atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(12): p. 2526-35.
133. Engelbertsen, D. and A.H. Lichtman, *Innate lymphoid cells in atherosclerosis.* Eur J Pharmacol, 2017.
134. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
135. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.* Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
136. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.* Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.

137. Zhou, L., M.M. Chong, and D.R. Littman, *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation.* Immunity, 2009. **30**(5): p. 646-55.
138. Basu, R., R.D. Hatton, and C.T. Weaver, *The Th17 family: flexibility follows function.* Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 89-103.
139. Zuniga, L.A., et al., *Th17 cell development: from the cradle to the grave.* Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 78-88.
140. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation.* Cell, 2010. **140**(6): p. 845-58.
141. Taleb, S., et al., *Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis.* J Exp Med, 2009. **206**(10): p. 2067-77.
142. Eid, R.E., et al., *Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells.* Circulation, 2009. **119**(10): p. 1424-32.
143. Gistera, A., et al., *Transforming growth factor-beta signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway.* Sci Transl Med, 2013. **5**(196): p. 196ra100.
144. Xie, J.J., et al., *The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice.* Cytokine, 2010. **49**(2): p. 185-93.
145. Smith, E., et al., *Blockade of interleukin-17A results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation, 2010. **121**(15): p. 1746-55.
146. Gao, Q., et al., *A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice.* J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5820-7.
147. Erbel, C., et al., *Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice.* J Immunol, 2009. **183**(12): p. 8167-75.
148. Butcher, M.J., et al., *The IL-17A/IL-17RA axis plays a proatherogenic role via the regulation of aortic myeloid cell recruitment.* Circ Res, 2012. **110**(5): p. 675-87.
149. Danzaki, K., et al., *Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(2): p. 273-80.
150. Lahoute, C., et al., *Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets.* Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(6): p. 348-58.
151. Jager, A. and V.K. Kuchroo, *Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation.* Scand J Immunol, 2010. **72**(3): p. 173-84.

152. 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.
153. Mor, A., et al., *Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes.* Eur Heart J, 2006. **27**(21): p. 2530-7.
154. Mor, A., et al., *Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 893-900.
155. Ait-Oufella, H., et al., *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice.* Nat Med, 2006. **12**(2): p. 178-80.
156. Clement, M., et al., *Control of the T follicular helper-germinal center B-cell axis by CD8(+) regulatory T cells limits atherosclerosis and tertiary lymphoid organ development.* Circulation, 2015. **131**(6): p. 560-70.
157. Lowin, B., et al., *Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways.* Nature, 1994. **370**(6491): p. 650-2.
158. Kagi, D., et al., *CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity.* Eur J Immunol, 1994. **24**(12): p. 3068-72.
159. Kagi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity.* Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
160. Kojima, H., et al., *Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes.* Immunity, 1994. **1**(5): p. 357-64.
161. Yang, X.D., et al., *Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process.* J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 995-1004.
162. Sarvetnick, N., et al., *Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma.* Nature, 1990. **346**(6287): p. 844-7.
163. Walsh, C.M., et al., *Immune function in mice lacking the perforin gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(23): p. 10854-8.
164. Dinesh, R.K., et al., *CD8+ Tregs in lupus, autoimmunity, and beyond.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(8): p. 560-8.
165. Pomie, C., I. Menager-Marcq, and J.P. van Meerwijk, *Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era.* Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 708-14.

166. Sinha, S., F.R. Itani, and N.J. Karandikar, *Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells.* Immunol Res, 2014. **59**(1-3): p. 254-65.
167. Inoue, T., et al., *Distinction of mouse CD8+ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms.* J Immunol, 1993. **150**(6): p. 2121-8.
168. Churlaud, G., et al., *Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 171.
169. Kurts, C., et al., *Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo.* J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 923-30.
170. Bevan, M.J., *Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo.* J Exp Med, 1995. **182**(3): p. 639-41.
171. Kovacsovics-Bankowski, M. and K.L. Rock, *A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules.* Science, 1995. **267**(5195): p. 243-6.
172. Burgdorf, S., et al., *Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 558-66.
173. Houde, M., et al., *Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 402-6.
174. Guermonprez, P., et al., *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.* Nature, 2003. **425**(6956): p. 397-402.
175. Delamarre, L., et al., *Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate.* Science, 2005. **307**(5715): p. 1630-4.
176. Belizaire, R. and E.R. Unanue, *Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(41): p. 17463-8.
177. Savina, A., et al., *NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells.* Cell, 2006. **126**(1): p. 205-18.
178. Jancic, C., et al., *Rab27a regulates phagosomal pH and NADPH oxidase recruitment to dendritic cell phagosomes.* Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 367-78.
179. Olofsson, P.S., et al., *CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice.* Circulation, 2008. **117**(10): p. 1292-301.

180. Cochain, C., et al., *Programmed cell death-1 deficiency exacerbates T cell activation and atherogenesis despite expansion of regulatory T cells in atherosclerosis-prone mice.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e93280.
181. Elhage, R., et al., *Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice.* Am J Pathol, 2004. **165**(6): p. 2013-8.
182. Kyaw, T., et al., *Cytotoxic and proinflammatory CD8+ T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice.* Circulation, 2013. **127**(9): p. 1028-39.
183. Cochain, C., et al., *CD8+ T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6C-high Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice.* Circ Res, 2015. **117**(3): p. 244-53.
184. Chyu, K.Y., et al., *CD8+ T cells mediate the athero-protective effect of immunization with an ApoB-100 peptide.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30780.
185. Zhou, J., et al., *CD8(+)CD25(+) T cells reduce atherosclerosis in apoE(-/-) mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2014. **443**(3): p. 864-70.
186. Kim, H.J., et al., *Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance.* Nature, 2010. **467**(7313): p. 328-32.
187. Haury, M., et al., *The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact.* Eur J Immunol, 1997. **27**(6): p. 1557-63.
188. Baumgarth, N., *The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions.* Nat Rev Immunol, 2011. **11**(1): p. 34-46.
189. Palinski, W., et al., *ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum.* Arterioscler Thromb, 1994. **14**(4): p. 605-16.
190. Tsiantoulas, D., et al., *B cells and humoral immunity in atherosclerosis.* Circ Res, 2014. **114**(11): p. 1743-56.
191. Lewis, M.J., et al., *Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice.* Circulation, 2009. **120**(5): p. 417-26.
192. Su, J., et al., *Antibodies of IgM subclass to phosphorylcholine and oxidized LDL are protective factors for atherosclerosis in patients with hypertension.* Atherosclerosis, 2006. **188**(1): p. 160-6.

193. 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. 2107-12.
194. Lopes-Virella, M.F., et al., *The uptake of LDL-IC by human macrophages: predominant involvement of the Fc gamma RI receptor.* Atherosclerosis, 1997. **135**(2): p. 161-70.
195. Kiener, P.A., et al., *Immune complexes of LDL induce atherogenic responses in human monocytic cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(7): p. 990-9.
196. Kyaw, T., et al., *B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions.* Circ Res, 2011. **109**(8): p. 830-40.
197. Ait-Oufella, H., et al., *B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice.* J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1579-87.
198. Kyaw, T., et al., *Depletion of B2 but not B1a B cells in BAFF receptor-deficient ApoE mice attenuates atherosclerosis by potently ameliorating arterial inflammation.* PLoS One, 2012. **7**(1): p. e29371.
199. Sage, A.P., et al., *BAFF receptor deficiency reduces the development of atherosclerosis in mice--brief report.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(7): p. 1573-6.
200. Hilgendorf, I., et al., *Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity.* Circulation, 2014. **129**(16): p. 1677-87.
201. Chousterman, B.G. and F.K. Swirski, *Innate response activator B cells: origins and functions.* Int Immunol, 2015. **27**(10): p. 537-41.
202. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis.* Nature, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
203. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond.* Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 26-35.
204. Scaffidi, C., et al., *Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.* EMBO J, 1998. **17**(6): p. 1675-87.
205. Li, H., et al., *Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.* Cell, 1998. **94**(4): p. 491-501.
206. Green, D.R., *Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors.* Cell, 2000. **102**(1): p. 1-4.

207. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 63-7.
208. Rodriguez, J. and Y. Lazebnik, *Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme.* Genes Dev, 1999. **13**(24): p. 3179-84.
209. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
210. Mallat, Z. and A. Tedgui, *Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance.* Br J Pharmacol, 2000. **130**(5): p. 947-62.
211. Cancel, L.M. and J.M. Tarbell, *The role of apoptosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers.* Atherosclerosis, 2010. **208**(2): p. 335-41.
212. Freyberg, M.A., et al., *Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(1): p. 141-9.
213. Marmur, J.D., et al., *Identification of active tissue factor in human coronary atheroma.* Circulation, 1996. **94**(6): p. 1226-32.
214. Clarke, M.C., et al., *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis.* Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1075-80.
215. Bolick, D.T., et al., *G2A deficiency in mice promotes macrophage activation and atherosclerosis.* Circ Res, 2009. **104**(3): p. 318-27.
216. Thorp, E., et al., *Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe-/- mice lacking macrophage Bcl-2.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(2): p. 169-72.
217. Thorp, E., et al., *Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe-/- and Ldlr-/- mice lacking CHOP.* Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 474-81.
218. Feng, B., et al., *Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10423-8.
219. Gautier, E.L., et al., *Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage.* Circulation, 2009. **119**(13): p. 1795-804.
220. van Vlijmen, B.J., et al., *Macrophage p53 deficiency leads to enhanced atherosclerosis in APOE*3-Leiden transgenic mice.* Circ Res, 2001. **88**(8): p. 780-6.

221. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule.* Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
222. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins.* Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
223. Moujalled, D.M., et al., *TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1.* Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e465.
224. Sun, L., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase.* Cell, 2012. **148**(1-2): p. 213-27.
225. Karunakaran, D., et al., *Targeting macrophage necroptosis for therapeutic and diagnostic interventions in atherosclerosis.* Sci Adv, 2016. **2**(7): p. e1600224.
226. Peter, C., et al., *Dangerous attraction: phagocyte recruitment and danger signals of apoptotic and necrotic cells.* Apoptosis, 2010. **15**(9): p. 1007-28.
227. Poon, I.K., M.D. Hulett, and C.R. Parish, *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance.* Cell Death Differ, 2010. **17**(3): p. 381-97.
228. Ravichandran, K.S., *Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums.* J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1807-17.
229. Schrijvers, D.M., et al., *Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1256-61.
230. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis.* J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1089-95.
231. Hanayama, R., et al., *Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes.* Nature, 2002. **417**(6885): p. 182-7.
232. Ait-Oufella, H., et al., *Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice.* Circulation, 2007. **115**(16): p. 2168-77.
233. Scott, R.S., et al., *Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER.* Nature, 2001. **411**(6834): p. 207-11.
234. Ait-Oufella, H., et al., *Defective mer receptor tyrosine kinase signaling in bone marrow cells promotes apoptotic cell accumulation and accelerates atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1429-31.
235. Gardai, S.J., et al., *Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte.* Cell, 2005. **123**(2): p. 321-34.

236. Boucher, P. and J. Herz, *Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond.* Biochem Pharmacol, 2011. **81**(1): p. 1-5.
237. Gold, L.I., et al., *Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease.* FASEB J, 2010. **24**(3): p. 665-83.
238. Boucher, P., et al., *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis.* Science, 2003. **300**(5617): p. 329-32.
239. Overton, C.D., et al., *Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse.* Circ Res, 2007. **100**(5): p. 670-7.
240. Yancey, P.G., et al., *Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(4): p. 787-95.
241. Kojima, Y., et al., *CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis.* Nature, 2016. **536**(7614): p. 86-90.
242. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
243. Kawai, T. and S. Akira, *Pathogen recognition with Toll-like receptors.* Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 338-44.
244. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity.* Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
245. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 461.
246. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
247. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.* Science, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
248. 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. 416-21.
249. 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.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(29): p. 10679-84.

250. Seimon, T.A., et al., *Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress.* Cell Metab, 2010. **12**(5): p. 467-82.
251. Monaco, C., et al., *Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis.* Circulation, 2009. **120**(24): p. 2462-9.
252. Flo, T.H., et al., *Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(3): p. 474-81.
253. Edfeldt, K., et al., *Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation.* Circulation, 2002. **105**(10): p. 1158-61.
254. Dunzendorfer, S., H.K. Lee, and P.S. Tobias, *Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity.* Circ Res, 2004. **95**(7): p. 684-91.
255. Mullick, A.E., P.S. Tobias, and L.K. Curtiss, *Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2.* J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3149-56.
256. Higashimori, M., et al., *Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(1): p. 50-7.
257. Oliveira-Nascimento, L., P. Massari, and L.M. Wetzler, *The Role of TLR2 in Infection and Immunity.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 79.
258. Schoneveld, A.H., et al., *Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development.* Cardiovasc Res, 2005. **66**(1): p. 162-9.
259. Manning-Tobin, J.J., et al., *Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(1): p. 19-26.
260. Choi, S.H., et al., *Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake.* Circ Res, 2009. **104**(12): p. 1355-63.
261. Howell, K.W., et al., *Toll-like receptor 4 mediates oxidized LDL-induced macrophage differentiation to foam cells.* J Surg Res, 2011. **171**(1): p. e27-31.
262. Castrillo, A., et al., *Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism.* Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 805-16.

263. Yang, K., et al., *Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein.* PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95935.
264. Pasterkamp, G., et al., *Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery.* Atherosclerosis, 2000. **150**(2): p. 245-53.
265. Orr, A.W., et al., *The subendothelial extracellular matrix modulates NF-kappaB activation by flow: a potential role in atherosclerosis.* J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 191-202.
266. Shekhonin, B.V., et al., *Relative distribution of fibronectin and type I, III, IV, V collagens in normal and atherosclerotic intima of human arteries.* Atherosclerosis, 1987. **67**(1): p. 9-16.
267. Babaev, V.R., et al., *Absence of regulated splicing of fibronectin EDA exon reduces atherosclerosis in mice.* Atherosclerosis, 2008. **197**(2): p. 534-40.
268. Tan, M.H., et al., *Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIIA domain in mice reduces atherosclerosis.* Blood, 2004. **104**(1): p. 11-8.
269. Prakash, P., et al., *Cellular fibronectin containing extra domain A promotes arterial thrombosis in mice through platelet Toll-like receptor 4.* Blood, 2015. **125**(20): p. 3164-72.
270. Doddapattar, P., et al., *Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(11): p. 2391-400.
271. Okamura, Y., et al., *The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4.* J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10229-33.
272. Cole, J.E., et al., *Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2372-7.
273. Richards, M.R., et al., *The LPS2 mutation in TRIF is atheroprotective in hyperlipidemic low density lipoprotein receptor knockout mice.* Innate Immun, 2013. **19**(1): p. 20-9.
274. Lundberg, A.M., et al., *Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in haematopoietic cells promotes atherosclerosis.* Cardiovasc Res, 2013. **99**(2): p. 364-73.

275. Salagianni, M., et al., *Toll-like receptor 7 protects from atherosclerosis by constraining "inflammatory" macrophage activation.* Circulation, 2012. **126**(8): p. 952-62.
276. Drickamer, K., *Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins.* J Biol Chem, 1988. **263**(20): p. 9557-60.
277. Drickamer, K., *Demonstration of carbohydrate-recognition activity in diverse proteins which share a common primary structure motif.* Biochem Soc Trans, 1989. **17**(1): p. 13-5.
278. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *Syk-coupled C-type lectins in immunity.* Trends Immunol, 2011. **32**(4): p. 151-6.
279. Kanazawa, N., *Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells.* J Dermatol Sci, 2007. **45**(2): p. 77-86.
280. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 491-529.
281. Taylor, P.R., et al., *The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages.* J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3876-82.
282. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals.* Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
283. Willment, J.A., et al., *The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells.* Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1539-47.
284. Olynych, T.J., D.L. Jakeman, and J.S. Marshall, *Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1-dependent mechanism.* J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(4): p. 837-43.
285. Rogers, N.C., et al., *Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins.* Immunity, 2005. **22**(4): p. 507-17.
286. Brown, G.D., *Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(1): p. 33-43.

287. Palma, A.S., et al., *Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using "designer" microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides.* J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5771-9.
288. Thiagarajan, P.S., et al., *Vimentin is an endogenous ligand for the pattern recognition receptor Dectin-1.* Cardiovasc Res, 2013. **99**(3): p. 494-504.
289. Szilagyi, K., et al., *Dectin-1 deficiency does not affect atherosclerosis development in mice.* Atherosclerosis, 2015. **239**(2): p. 318-21.
290. Mor-Vaknin, N., et al., *Vimentin is secreted by activated macrophages.* Nat Cell Biol, 2003. **5**(1): p. 59-63.
291. Xu, S., et al., *LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers.* Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2859-72.
292. Kataoka, H., et al., *Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions.* Circulation, 1999. **99**(24): p. 3110-7.
293. Kataoka, H., et al., *Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in human atherosclerotic lesions.* Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 328-35.
294. Mehta, J.L., et al., *Deletion of LOX-1 reduces atherogenesis in LDLR knockout mice fed high cholesterol diet.* Circ Res, 2007. **100**(11): p. 1634-42.
295. Inoue, K., et al., *Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice.* Circ Res, 2005. **97**(2): p. 176-84.
296. Cominacini, L., et al., *The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide.* J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13750-5.
297. Xu, X., et al., *Anti-LOX-1 rescues endothelial function in coronary arterioles in atherosclerotic ApoE knockout mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(4): p. 871-7.
298. Chen, J., et al., *Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells.* Circ Res, 2004. **94**(3): p. 370-6.
299. Lu, J., et al., *Mediation of electronegative low-density lipoprotein signaling by LOX-1: a possible mechanism of endothelial apoptosis.* Circ Res, 2009. **104**(5): p. 619-27.

300. Li, D., et al., *Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 601-5.
301. Zhu, H., et al., *Ox-LDL plays dual effect in modulating expression of inflammatory molecules through LOX-1 pathway in human umbilical vein endothelial cells.* Front Biosci, 2005. **10**: p. 2585-94.
302. Schaeffer, D.F., et al., *LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma.* J Lipid Res, 2009. **50**(8): p. 1676-84.
303. Pirillo, A., G.D. Norata, and A.L. Catapano, *LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis.* Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 152786.
304. Perrin-Cocon, L., et al., *Oxidized low-density lipoprotein promotes mature dendritic cell transition from differentiating monocyte.* J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3785-91.
305. Nickel, T., et al., *oxLDL uptake by dendritic cells induces upregulation of scavenger-receptors, maturation and differentiation.* Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 442-50.
306. Sun, Y. and X. Chen, *Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species.* Fundam Clin Pharmacol, 2011. **25**(5): p. 572-9.
307. Eto, H., et al., *Expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in smooth muscle cells after vascular injury.* Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 591-8.
308. Hu, C., et al., *LOX-1 deletion decreases collagen accumulation in atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor knockout mice fed a high-cholesterol diet.* Cardiovasc Res, 2008. **79**(2): p. 287-93.
309. Kataoka, H., et al., *Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(6): p. 955-60.
310. Aoyama, T., et al., *LOX-1 mediates lysophosphatidylcholine-induced oxidized LDL uptake in smooth muscle cells.* FEBS Lett, 2000. **467**(2-3): p. 217-20.
311. Yamasaki, S., et al., *Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(10): p. 1179-88.

312. Bugarcic, A., et al., *Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind Candida albicans.* Glycobiology, 2008. **18**(9): p. 679-85.
313. Wells, C.A., et al., *The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to Candida albicans.* J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7404-13.
314. Yamasaki, S., et al., *C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, Malassezia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1897-902.
315. Kiyotake, R., et al., *Human Mincle Binds to Cholesterol Crystals and Triggers Innate Immune Responses.* J Biol Chem, 2015. **290**(42): p. 25322-32.
316. Ishikawa, E., et al., *Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle.* J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2879-88.
317. Schoenen, H., et al., *Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate.* J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2756-60.
318. Clement, M., et al., *Necrotic Cell Sensor Clec4e Promotes a Proatherogenic Macrophage Phenotype Through Activation of the Unfolded Protein Response.* Circulation, 2016. **134**(14): p. 1039-1051.
319. Smith, J.D., et al., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8264-8.
320. Schraml, B.U., et al., *Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage.* Cell, 2013. **154**(4): p. 843-58.
321. Sancho, D., et al., *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity.* Nature, 2009. **458**(7240): p. 899-903.
322. Sancho, D., et al., *Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin.* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2098-110.
323. Huysamen, C., et al., *CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes.* J Biol Chem, 2008. **283**(24): p. 16693-701.
324. Ahrens, S., et al., *F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells.* Immunity, 2012. **36**(4): p. 635-45.

325. Zhang, J.G., et al., *The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments.* Immunity, 2012. **36**(4): p. 646-57.
326. Zelenay, S., et al., *The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice.* J Clin Invest, 2012. **122**(5): p. 1615-27.
327. Iborra, S., et al., *The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice.* J Clin Invest, 2012. **122**(5): p. 1628-43.
328. Sancho, D. and C. Reis e Sousa, *Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors.* Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 46-52.
329. Caminschi, I., et al., *The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement.* Blood, 2008. **112**(8): p. 3264-73.
330. Joffre, O.P., et al., *Efficient and versatile manipulation of the peripheral CD4+ T-cell compartment by antigen targeting to DNGR-1/CLEC9A.* Eur J Immunol, 2010. **40**(5): p. 1255-65.
331. Yamazaki, S., et al., *CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells.* J Immunol, 2008. **181**(10): p. 6923-33.
332. Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen.* Nat Immunol, 2005. **6**(12): p. 1219-27.
333. Lahoud, M.H., et al., *Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype.* J Immunol, 2011. **187**(2): p. 842-50.
334. Li, J., et al., *Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates.* Eur J Immunol, 2015. **45**(3): p. 854-64.
335. Mallat, Z., et al., *Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis.* Circ Res, 1999. **85**(8): p. e17-24.
336. Robertson, A.K., et al., *Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis.* J Clin Invest, 2003. **112**(9): p. 1342-50.
337. Yin, H., et al., *Syk negatively regulates TLR4-mediated IFNbeta and IL-10 production and promotes inflammatory responses in dendritic cells.* Biochim Biophys Acta, 2016. **1860**(3): p. 588-98.
338. Gautier, E.L., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages.* Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1118-28.

339. Page, T.H., et al., *Tyrosine kinases and inflammatory signalling.* Curr Mol Med, 2009. **9**(1): p. 69-85.
340. Xu, S., et al., *Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells.* J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22005-11.
341. Sanson, M., et al., *Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression.* Circ Res, 2009. **104**(3): p. 328-36.
342. Slack, E.C., et al., *Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan.* Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1600-12.
343. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
344. Chavez-Sanchez, L., et al., *The activation of CD14, TLR4, and TLR2 by mmLDL induces IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in human monocytes and macrophages.* Lipids Health Dis, 2010. **9**: p. 117.
345. Cao, Q., et al., *IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 933-42.

8.4 Table des index

A

ABCA1..... 31, 75, 132
ABCG1.....31, 132
ADN 64, 132
adventice.....19, 20
Ag 37, 38, 132
AHA..... 14, 16, 132
anti-athérogènes.....93
antigènes.... 27, 36, 37, 38, 40, 52, 88, 89, 102, 132
antioxydantes.....22
APAF-1 .....60, 132
APC 132
ApoE-/- 18, 19, 24, 31, 32, 40, 41, 42, 45, 46, 48, 52, 63, 73, 75, 76, 77, 91, 92, 97, 99, 103, 104, 132
apoptose..... 53, 56, 59, 61, 62, 63, 64, 67, 68, 74, 81, 82, 92
ARN 82, 132
athérogène . 24, 42, 93
athérome..... 15, 21, 22
athérosclérose....1, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 26, 29, 31, 32, 33, 35, 39, 40, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 73, 74, 76, 79, 80, 81, 82, 84, 91, 92, 96, 99, 103, 107
athérothrombose....62
ATP.....31, 66, 132
autophagie ..59, 63, 64

B

BATF-3 132
Bax 83, 132
bcl-2.....63
Bcl2 40
Bcl-2 83
Bcl-2 132
Bcl-2 132
BDCA2 .....42, 132
BDCA-3.....86, 132
Bid 60, 132
B-regs..... 132

C

CALR....68, 132
CAM 24, 132
CCL....32, 132
CD 91
CD11c-DTR CD11c- 133
CD99....25, 132
cDC.... 132
CDP 86, 133
CE 81, 82, 133
Cellules Musculaires Lisses....19, 133
cellules spumeuses15, 19, 29, 31, 34, 40, 74, 75, 82, 83, 85
centre nécrotique..17, 25, 53, 61, 62, 68, 69
chape fibreuse..15, 16, 17, 19, 25, 48, 62
chimiokines24, 26, 32, 38, 73
cholestérol. 15, 19, 23, 31, 32, 40, 74, 75, 84, 85, 91, 92, 95, 103, 104, 105
cholestérolémie....91
Chop 85, 105, 133
cIAP....64, 133
Clec4e 79, 102
CLEC4E....79, 133
Clec9a 1, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 133
Clec9a$^{-/-}$91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 108
CLR....77, 78, 79, 89, 102, 133
CMH-I . 38, 88, 89, 133
CMH-II..38, 40, 41, 50, 89, 133
CML 19, 23, 25, 30, 48, 62, 65, 66, 75, 81, 83, 133
contraintes hémodynamiques 16
CRD.... 77, 133
Csf-1 .... 85, 133
CTLD 77, 133
CYLD 64, 133
cytokines.... 23, 24, 26, 32, 34, 35, 38, 39, 44, 47, 53, 74, 82, 84, 93, 107
cytokines pro-inflammatoires 23, 24, 26, 27, 33, 34, 35, 53, 74, 82

D

DAMPs 37, 65, 70, 133
DAP12 .... 78, 133
DC 36, 37, 38, 39, 40, 66, 67, 86, 88, 89, 94, 95, 96, 97, 105, 106, 107, 133
DISC.... 60, 133
DNGR-1.... 86, 133
DT 99, 133

E

EEA1 ....88, 105, 133
efférocytose 63, 65, 67, 68, 92, 103
endosome tardif.... 31
endothélium vasculaire.... 16, 21, 23, 24
ER 136
ESL-1 .... 24, 133

F

facteurs vasoconstricteurs 81
FC 31, 133
FcRγ 84, 134
FLT3-L 134
FOXP3 .... 48, 89, 134

G

Gas6 .... 68, 134
GM-CSF 134

H

HDL 19, 134
HSC.... 36, 134
hypercholestérolémie 13, 19, 92, 104

I

ICAM-1.... 24, 134
IgA 46, 134
IgG 46, 89
IgM 46
IL-10 .... 46, 47, 48, 52, 54, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 106, 107
IL1-β 134
ILC.... 47, 134
ILDL 18, 134
immunoglobulines .25
infarctus du myocarde....16
infiltration leucocytaire intimale 23
inflammation....20, 29, 31, 32, 68, 82, 93
intima....14, 19, 20, 22, 23, 25, 62, 81
IRAK 72, 134
Ire1α.....85, 105, 134
IRF.... 134
Irf8 95
ITAM. 78, 79, 102, 134
ITIM 78, 79, 134
iTreg....48, 134

J

JAM....25, 134

L

LB1....46, 134
LB-IRA 57, 134
LDL. 18, 19, 22, 23, 31, 40, 41, 46, 73, 107, 134
LDLr-/-.19, 24, 32, 40, 42, 46, 48, 49, 68, 74, 76, 80, 81, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 103, 104, 134
lectine C 77, 79, 81, 86
leucocytes circulants 22
LFA-1....24, 135
limitante élastique . 20
LOX1.... 135
LPC....83, 135
LRP1....68, 135
LRR 70, 135

LT CD4..... 38, 45, 135
LTc 135
LTfh 90, 135
LXR..... 135
lymphocytaire.....93
lymphocyte.....93, 95
lymphocyte T.....93, 95

M

Mac-1 .....24, 135
macrophages 14, 15, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 42, 46, 47, 48, 62, 65, 66, 67, 68, 70, 74, 75, 80, 81, 82, 84, 85, 93, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 107
macrophages spumeux isolés.. 14
macrophagique30, 33, 63, 73, 77, 93
maladies cardiovasculaires 12
MAPK 72, 135
MCP-1 ..... 76, 82, 135
M-CSF..... 135
MEC.....23, 25, 75, 135
média 19, 20, 25
médiateurs cytotoxiques..... 53
Mertk.....68, 135
MFGE8 .....68, 135
MINCLE 79, 135
MLKL 64, 65, 135, 136
mmLDL.....75, 135
MMP 25, 74, 135
MMP9.....75, 135
molécules liposolubles 22
monocytes . 24, 26, 27, 28, 29, 33, 36, 53, 57, 80, 82, 87, 99, 100
MYD88 71, 72, 73, 135
myélopoïèse..... 53

N

nécroptose 63, 64, 65, 66
nécrose 59, 63, 64
NEMO 72, 135
neutrophiles 47, 80, 84
NF-kB.....135
NLR..... 32, 135, 136
NLRP3 ..... 32, 136
NO 46, 62, 82, 136
NOX2..... 51, 136
nTreg 48, 136

O

OLS.....37, 38, 136
OMS 14, 136
OxLDL... 23, 24, 32, 65, 67, 75, 82, 83, 104, 105, 136

P

Pam3CSK4..... 74, 136
PAMPs 37, 70, 88, 136
PARP1 ..... 64, 136
pDC..... 86, 136
PDCA-1..... 42, 136
PECAM1..... 25, 136
peptides..... 38
PGSL-1..... 24, 136
phénotype pro-inflammatoire ...33, 53
phosphatidylsérine59, 62, 67, 68
plaque d'athérosclérose15
plasmatique..... 18, 19, 22, 23, 40, 91, 92, 95, 103
plasticité 28, 30, 33, 34
pMLKL 65, 136
précurseurs embryonnaires ..29
protéoglycanes.....23
PRR.....38, 39, 77, 136

R

Rab 136
Rag2-/- 49, 136
RE 75, 85, 105
régime.. 19, 42, 52, 53, 74, 91, 92, 93, 94, 95, 97, 98, 99, 103, 104, 106
régime hyper-lipidique 19
régions proathérogènes.21
RIPK1 ..... 63, 64, 136
RLR.....136
rolling..... 24, 25
RORγt 47, 136
ROS.32, 62, 65, 80, 82, 136

S

sélectines.....23
SRA 74, 136
SRB..... 136
STAT-3.....47, 137
strie lipidique 14, 19
SYK..... 78, 87, 137
Syk/CARD9.....84, 137

T

TAB 72, 137
TAK1 ..... 64, 72, 137
TAP 50, 137
T-bet.....45, 137
Tcf4/E2-2.....42, 137
TCR 38, 137
TDB 85, 137
TGFβ..... 137
TGF-β... 64, 89, 93, 137
Th 49, 137
thrombus.....14, 62
TIR..... 71, 72, 137
TLR. 38, 71, 72, 73, 74, 78, 137
TNF-α..... 32, 64, 137
TRAF6.....72, 137
transmigration.....25
TRIF 71, 72, 75, 137

U

ulcération.....14, 16
UPR 85, 105, 137

V

VCAM-1 .....24, 137
VLA-4 .....24, 137
VLDL..... 18, 40, 137

X

Xbp1 .....85, 105, 137

Z zones
antiathérogènes 21