

UNIVERSITE MONTPELLIER 1

U.F.R Pharmaceutiques

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 1

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Spécialité Biologie-santé

présentée et soutenue publiquement par

HAMZE Moustafa

**MECANISME DES REPONSES IMMUNES ADAPTATIVES AU COURS
DE L'EVOLUTION DE LA MALADIE ATHEROMATEUSE HUMAINE,
MARQUEURS INFLAMMATOIRES PREDICTIFS DES EVENEMENTS
CARDIOVASCULAIRES AIGUS.**

Jury :

Pr. Marie-Paule LEFRANC
Dr. Paul GUGLIELMI
Dr. Aimé VAZQUEZ
Dr. Jean-Luc TEILLAUD
Pr. Pierre CORBEAU

Président
Directeur de Thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

RESUME

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique déclenchée par l'accumulation de lipides et caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires dans la paroi artérielle. Les études de modèles animaux révèlent des résultats paradoxaux concernant l'effet des cellules B (protecteur ou pro-athérogène). Pour avoir une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'athérome humain, nous avons caractérisé les LB résidents et leur production d'immunoglobulines.

Treize patients subissant une endartériectomie carotidienne ont été examinés et disséqués pour isoler l'intima et l'adventice. Cette dernière est la couche principale de la domiciliation des cellules B qui constituent des infiltrats diffus ou des agrégats. L'analyse par RT-PCR montre la production locale d'IgA chez tous les patients et d'IgG chez la majorité. L'IgM est plus rarement détectée. De plus, les chaînes légères sont majoritairement d'isotype λ . L'étude du répertoire des récepteurs d'antigènes montre que l'adventice contient un nombre limité de clones B avec une utilisation récurrente de quelques sous familles de VH. Ces lymphocytes secrètent majoritairement des immunoglobulines hypermutées. Ces anticorps ont été reconstruits et montrent une bonne capacité discriminante en reconnaissant des antigènes tissulaires particuliers. D'autre part, l'analyse des séquences suggère une maturation locale sous la pression des antigènes locaux. Des parties variables d'immunoglobulines différentes (H ou L) codent pour le même CDR3 montrant ainsi une maturation convergente. De plus, l'expression de la cytidine déaminase AID est détectée chez quelques patients, ce qui est compatible avec l'observation d'une commutation de classe dans certains clones B adventitiels. La majorité de cellules B de l'adventice artérielle sont des plasmablastes n'exprimant pas le marqueur CD20 et sécrétant des cytokines inflammatoires (IL-6, GM-CSF et TNF- α). Les marqueurs clonotypiques CDR3 indiquent que l'adventice et la plaque ont des répertoires différents et qu'une population de cellules B circule entre l'adventice et les ganglions.

SUMMARY

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease initiated by lipid accumulation and characterized by immune cells infiltration within arterial walls. Animal models suggest that B cells may have contradictory protective or pro-atherogenic effects. To further understand the pathophysiology of human atheroma, we analyzed Ig production and characterized resident B lymphocytes within vascular lesions.

Tissue samples from 13 patients undergoing carotid endarterectomy were examined and dissected to isolate intimal plaques and tunica adventitia. This latter is the main site of B cells homing. These lymphocytes constituted diffuse infiltrates or formed small cell clusters. Functional IgA was present in all adventitias while IgG was detected in the majority. IgM transcripts were less abundant or even absent. Most L chain transcripts were of the λ type. BCR analysis indicated that individual samples contained each a limited number of B cell clones with a bias for the recurrent utilization of some particular V region sub-families. These lymphocytes produced mainly hypermutated immunoglobulins. Engineered reconstructed antibodies were discriminative as recognizing tissue specific antigens. On the other hand, BCR sequence analysis suggests a local maturation and antigen driven evolution. Both intraclonal diversification and convergence of CDR sequences between different B cell clones were observed. Expression of the cytidine deaminase AID was detected in several arterial wall samples, in keeping with the observation of a local H chain class switch. The majority of resident B lymphocytes are CD20 negative plasmablasts that secrete inflammatory cytokines (IL-6, GM-CSF, and TNF- α). CDR3 clonotypic markers revealed that plaque and adventitia repertoires were different and indicated that a population of B cells was circulating between adventitia and draining lymph nodes.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Effet du déficit en facteurs d'adhésion sur la formation des stries lipidiques	24
Tableau 2 : Cytokines et expression des sous classes d'IgG	60
Tableau 3 : Marqueurs de surface des lymphocytes B humains à différents stades (naïf, plasmablaste, plasmocyte, mémoire).....	63
Tableau 4 : Caractéristiques des sous-classes d'IgG humaines	66
Tableau 5 : Caractéristiques des différents isotypes d'anticorps humains.	68
Tableau 6 : Les chaînes légères isolées des patients (05 et 09) et utilisées dans les constructions.	122

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre de décès et d'incidences prévues pour maladies cardiovasculaires	18
Figure 2 : Structure de l'artère normale de moyen et gros calibre..	20
Figure 3 : Chronologie du développement des lésions chez les souris <i>ApoE</i> ^{-/-}	21
Figure 4 : Type de monocytes humains et murins..	23
Figure 5 : Mécanisme et chronologie de la formation des stries lipidiques.	25
Figure 6 : Polarisation de cellules T dans l'athérosclérose	31
Figure 7 : Progression de plaque d'athérosclérose humaine	32
Figure 8 : Accumulation des cellules inflammatoires dans l'adventice	33
Figure 9 : Rôles possibles des lymphocytes B dans l'athérosclérose	37
Figure 10 : Les épitopes oxydés sont responsables de la réaction croisée.	42
Figure 11 : Organisation du locus de chaînes lourdes et légères humaines.....	48
Figure 12 : Structure d'un anticorps.....	48
Figure 13 : Séquences signaux de recombinaison chez l'homme.	49
Figure 14 : Mécanisme de la recombinaison.	50
Figure 15 : Relation entre recombinaison VDJ et différenciation des cellules B	53
Figure 16 : Schéma représentatif du centre germinatif	57
Figure 17 : Implication de l'AID dans l'hypermutation somatique..	58
Figure 18 : Mécanisme de la commutation de classe des immunoglobulines	59
Figure 19 : Rôles de BCL-6 et Blimp-1 dans la différenciation des cellules B.....	63
Figure 20 : Matériel génétique de départ.	123
Figure 21 : Amplification des fragments d'ADN constituant les chaînes chimères.	125
Figure 22 : Constructions finales des différentes chaînes (λ , κ , H)..	126

Figure 23 : Analyse des Ig secrétés.	127
Figure 24 : Immuno-révélation sur les extraits protéiques des artères du rat en utilisant les 3 Ac chimères obtenus (D22, F14, L16).	128

Abréviations

ABC B1	ATP-binding cassette B1 transporter (ABC B1)
Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'Ac (Antibody dependent cellular cytotoxicity)
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AID	Activation Induced cytidine Deaminase
AmpR	Gène de résistance à l'ampicilline
APRIL	A Proliferation Inducing Ligand
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
BAFF	B-cell activating factor
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BCL-6	B-cell lymphoma 6
BCR	Récepteur pour l'antigène des lymphocytes B
BDCA	Blood dendritic cell antigen
Beff	B effectrices
Blimp-1	B-lymphocyte-induced maturation protein-1
BLYS	Stimulateur de lymphocyte B
Breg	B régulatrices
C	Constante
CD	Cellule dendritique
CDF	Cellule dendritique folliculaire
CDR	Complementary determining region
CG	Centre germinatif
Chaîne H	Chaîne lourde
Chaîne L	Chaîne légère

CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellule musculaire lisse
CPA	Cellule présentatrice d'antigène.
CSR	Class switch recombinaison (commutation de classe)
CV	Cardiovasculaire
CVID	Common variable immunodeficiency
D	Gène de diversité
DAMP	Danger associated molecular pattern
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's medium
dNTP	Désoxyribonucléotides
E- sélectine	Endothelial-cell selectin)
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale.
ECPR	Récepteur à la protéine C
ELISA	Enzyme-linked immuosorbent assay
ENH	Activateur 3' (Enhancer)
Fc	Fragment cristallisable
FcR	Récepteur de Fc
FO	Folliculaire
FR	Framework region
G418	Géniticine
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HDL	Lipoprotéine de densité élevée
HEV	High endothelial venules
HFD	Régime riche en graisse
HIGM	Syndrome humain de déficit immunitaire avec hyper IgM
HMG	High mobility group
HMS	Hypermutation somatique

HSP	Heat shock proteins
IC	Immun-complexe - complexe immun
ICAM-1	Intracellular cell adhesion molecule
Id3	Inhibitor of differentiation 3
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IgH	Locus de chaîne lourde
Ig λ	Locus de chaîne légère
Ig λ c	Partie constante de la chaîne λ
IL	Interleukine
IP-10	Inductible protein-10
I-TAC	Interferon inducible T-cell alpha chemoattractant
ITAM	Immuno-receptor tyrosine-based activating motif
ITIM	Immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif
J	Jonction
kDa	kilo-dalton
KO	knock-out
LB	Lymphocyte B
LDL r	Récepteur aux LDL
LDLox	Lipoprotéine de basse densité oxydée
LPS	Lipopolysaccharides
LT	Lymphocyte T
LT (α , β)	Lymphotoxine (α , β)
M1	Macrophage inflammatoire
M2	Macrophage anti-inflammatoire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	Monocyte chemokine protein-1
M-CSF	Monocyte-colony stimulating factor
MEC	Matrice extracellulaire

Mig	Monokine induced par IFN- γ
MMP	Métallo-protéases matricielles
MMR	Système de réparation de mésappariement nucléotidique.
MoC λ	Domaine constante murine de la chaîne légère λ
MoG2A	Domaine constante murine de la chaîne lourde
MZ	zone marginale
NCBI	National center for biotechnology information
NéoR	Gène de résistance à la généticine,
Neu5GC	Acide sialique N-glycolyneuraminic
NHEJ	Non-homologous end joining
NKT	Lymphocyte natural killer T
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
Pr	Promoteur
PRR	Pattern-recognition receptor
PSGL-1	Selectin glycoprotein ligand – 1
RAG	Recombination activating genes
RSS	Séquences signal de recombinaison
SDF	Stromal cell derived factor
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SEP	Sclérose en plaque
SIGN	Cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin
SR	Récepteur scavenger
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SVF	Sérum de VoEAU Fœtal
TBE	Tris-borate-EDTA
TCR	Récepteur antigénique de la cellule T

TD	Réponse T-dépendante
TdT	Déoxynucléotidyl terminale transférase
TEMED	Tetraméthyléthylènediamine
TFH	T Folliculaire Helper
TGF	Transforming/Tumor growth factor
Th	T helper
TI	Réponse T-indépendante
TIMP	Inhibiteurs tissuulaires des MMP
TLO	Tertiary lymphoid organ
TLR	Toll like receptor
TNFR	récepteur du TNF
Treg	T régulatrice
UNG	Uracile glycosylase
V	Région variable
VALT	Vascular associated lymphoid tissue
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule
VLDL	Very low density lipoproteine
VV	Vasa vasorum
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside

SOMMAIRE

1	Chapitre 1 : ATHEROSCLEROSE.....	18
1.1	Généralités	18
1.2	Structure d'une artère normale.....	19
1.3	Physiopathologie de l'athérosclérose	20
1.3.1	Modèles animaux.....	20
1.3.2	Mécanisme de l'athérosclérose.....	21
1.3.2.1	Infiltration de lipoprotéines.....	21
1.3.2.2	Activation endothéliale	22
1.3.2.3	Recrutement des monocytes.....	22
1.3.2.4	Rôle des macrophages et formation des cellules spumeuses	24
1.3.2.5	Les cellules dendritiques.....	26
1.3.2.6	Lymphocytes T	26
1.3.2.7	Stades avancés et compliqués - Progression des plaques	31
1.3.2.8	Adventice et structure lymphoïde tertiaire	32
1.3.2.9	Participation des cellules B à l'athérosclérose	34
1.4	Antigènes	38
1.4.1	Lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox).....	38
1.4.2	Heat Shock Proteins (HSP)	40
1.4.3	Glycosylphosphatidylinositol (GPI) et phospholipides	41
1.4.4	Bactéries	41
1.4.5	Autres antigènes divers	42
1.5	Cytokines	43
1.5.1	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF).....	43
1.5.2	Interleukine-6	43
1.5.3	Lymphotoxine- α (LT- α).....	44
1.5.4	Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	44
2	Chapitre 2 : LYMPHOCYTE B.....	47
2.1	Généralités	47
2.2	Description des locus des immunoglobulines humaines	47
2.2.1	Chaînes lourdes.....	47
2.2.2	Chaînes légères.....	48
2.3	Réarrangements des immunoglobulines	48

2.4	Lymphopoïèse et différenciation des cellules B	50
2.4.1	Cellule souche progénitrice	51
2.4.2	Stade pré-pro B.....	51
2.4.3	Stade pro-B.....	51
2.4.4	Stade pré-B.....	51
2.4.5	Stade B immature	52
2.5	Maturation périphérique des LB	53
2.5.1	Réponse primaire - Réponse T-indépendante (TI)	54
2.5.1.1	Antigènes.....	54
2.5.1.2	Cellules engagées	54
2.5.2	Réponse T-dépendante (TD)	55
2.6	Modifications	57
2.6.1	Hypermutation somatique (HMS)	57
2.6.2	Commutation de classe	58
2.6.2.1	Rôle des cytokines dans la commutation de classe des cellules B	59
2.7	Différenciation terminale en lymphocytes B mémoires et plasmocytes	61
2.7.1	Lymphocyte B mémoire.....	61
2.7.2	Plasmocyte.....	62
2.8	Régulation de la transcription :	63
2.8.1	Promoteur VH	63
2.8.2	Activateur transcriptionnel intronique E μ	64
2.9	Les Anticorps : Des molécules effectrices.....	64
2.10	B régulateurs de l'immunité (sécrétion des cytokines)	68
2.10.1	Sécrétion de Cytokines	68
2.10.2	Présentation d'antigènes	70
2.10.3	Néo-organogénèse.....	70
3	Article 1. Characterization of resident B cells of vascular walls in human atherosclerotic patients.....	73
4	Chapitre 4 : Identification des antigènes	115
4.1	Introduction.....	115
4.2	Choix méthodologique	115
4.3	Matériels et méthodes.....	117
4.3.1	PCR.....	117
4.3.2	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	117
4.3.3	Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose.....	117
4.3.4	Clonage d'un produit de PCR.....	117

4.3.5	Ligation	118
4.3.6	Préparation de l'ADN plasmidique.....	118
4.3.7	Extraction d'ADN génomique.....	119
4.3.8	Quantification de l'ADN et de l'ARN	119
4.3.9	Analyse des séquences	119
4.3.10	Digestion par des enzymes de restriction	119
4.3.11	Transfection Cellulaire	120
4.3.12	Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (PAGE)	120
4.3.12.1	Coloration.....	120
4.3.13	Immuno-révélation de type Western blot	120
4.3.13.1	Révélation	121
4.3.14	Purification.....	121
4.3.15	ELISA (Enzyme-Linked Immuosorbent Assay-indirect).....	121
4.3.16	Extraction protéique	121
4.3.17	Clonage et dilution limite	122
4.4	Résultats.....	122
4.4.1	Sélection des séquences	122
4.4.2	Construction des chaînes légères chimères	123
4.4.3	Développement des chaînes lourdes chimères	124
4.4.4	Expression de l'anticorps chimère.....	126
4.4.5	Identification des antigènes :.....	127
4.5	Discussion.....	128
5	Conclusions.....	131
6	Perspectives.....	133
7	Références bibliographiques	138

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :

ATHEROSCLEROSE

1 Chapitre 1 : ATHEROSCLEROSE

1.1 Généralités

L'organisation mondiale de la santé (OMS) déclare qu'il y a 7,2 millions de décès annuels dans le monde par cardiopathies ischémiques et 4,6 millions par accidents cardiovasculaires cérébraux. Les maladies cardiovasculaires (CV) sont donc une véritable menace pour la santé publique. Elles sont la première cause de mortalité dans le monde et la deuxième en France. Bien que la mortalité baisse, l'incidence des maladies CV augmente significativement (figure 1) [1]. Parallèlement, l'augmentation effrayante de syndrome métabolique devrait entraîner une augmentation du nombre des patients atteints de maladies cardiovasculaires. Une croissance de 45 % de surpoids et de l'obésité en 2030 dans tous les pays du monde est prévue.

L'athérosclérose est la principale cause des maladies cardiovasculaires. Elle se traduit par des pathologies chroniques comme l'angor d'effort et des maladies aiguës souvent mortelles comme l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral.

La définition de l'athérosclérose donnée par l'OMS est : «L'athérosclérose est une association variable de remaniement de l'intima des artères de gros et moyen calibre. C'est une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires».

L'interaction complexe entre les différents acteurs cellulaires vasculaires contrôle l'intégrité de la paroi artérielle et de l'homéostasie vasculaire. Toute perturbation de cet équilibre conduit à un dysfonctionnement endothélial observé dans plusieurs pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie complexe et multifactorielle dans laquelle l'inflammation joue un rôle majeur et participe à toutes les étapes du développement de la pathologie. Elle implique des facteurs génétiques autant que des facteurs métaboliques, environnementaux et vasculaires. Toutes ces facteurs contrôlent les premiers stades de l'athérosclérose et modulent la progression des lésions.

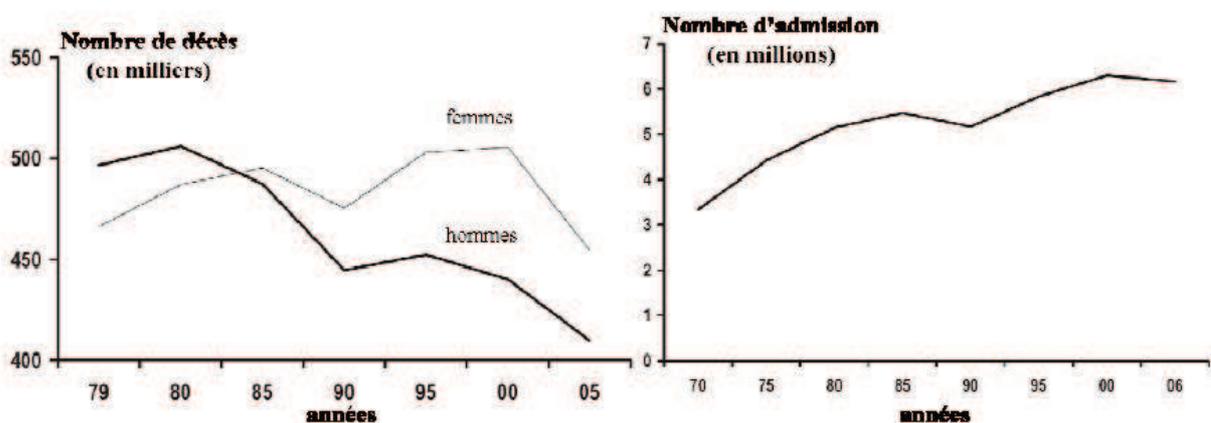


Figure 1 : Nombre de décès et nombre d'incidences prévues pour maladies cardiovasculaires [2].

Cette maladie est une pathologie inflammatoire progressive déroulant en plusieurs étapes commençant dès l'enfance chez les nourrissons [3].

Il est donc urgent de découvrir et de moduler les mécanismes pathologiques et inflammatoires qui contribuent à la progression de la maladie ainsi qu'aux complications comme l'ischémie et la thrombose [4].

Des nombreuses études ont élucidé le rôle des cellules inflammatoires et leurs contributions à la pathologie. Par contre, la nature et les fonctions des cellules B restent non connues. Des études ont attribué des propriétés paradoxales aux cellules B circulantes. Elles se sont intéressées aux LB circulants d'une façon systémique et pas aux lymphocytes B résidents dans l'adventice qui agissent directement sur la progression de la maladie.

Le but de notre étude consiste à caractériser les cellules B résidentes dans l'adventice et trouver leurs antigènes cibles. A cette fin, nous avons disposé de 13 adventices, 13 plaques, 10 microdissections et quelques ganglions provenant de patients atteints.

1.2 Structure d'une artère normale

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques : L'intima, la média et l'adventice (figure 2).

-Intima : c'est la couche la plus interne, en contact avec la lumière artérielle. Elle est très fine et constituée d'une monocouche des cellules endothéliales formant un manteau protecteur. L'intima contient aussi un espace sous endothélial riche en matrice extracellulaire et tissu fibro-élastique. Cette couche sous endothéliale est la zone la plus sensible au déclenchement et au développement des lésions d'athérosclérose, suite à l'accumulation de LDL oxydées (LDLox) et de cellules immunitaires. Physiologiquement, l'endothélium participe à plusieurs processus physiologiques tels que la synthèse de médiateurs vasoactifs, l'inhibition de la thrombose et au recrutement des cellules immunitaires.

-Média : c'est la tunique intermédiaire et la plus épaisse. Elle est le constituant majeur de l'artère de gros et moyen calibre. Cette couche est formée de cellules musculaires lisses (CML) organisées sous forme lamellaire. Le nombre de ces couches (lames) varie selon l'artère (rares dans les artérioles et nombreuses dans les artères élastiques). Ces cellules contractiles sont entourées par une matrice extracellulaire riche en fibres élastiques (collagène et élastine). Cette couche est bordée des 2 côtés par les limitantes élastiques interne et externe. Sa portion externe est vascularisée par les vasa vasorum provenant de l'adventice.

-l'adventice : c'est la couche externe. Elle est constituée par un tissu conjonctif riche en collagène, CML et fibroblastes. Elle est entourée par un tissu graisseux. Cette couche est marquée par une innervation neurologique autonome et une riche vascularisation en vasa vasorum. De nombreuses études ont détecté des cellules immunitaires dans l'adventice suggérant une participation active de cette couche aux maladies cardiovasculaires. De plus, de nombreux auteurs considèrent que cette couche est le point de départ de l'athérosclérose. Cette couche, sujet de notre étude, va être discutée plus tard.

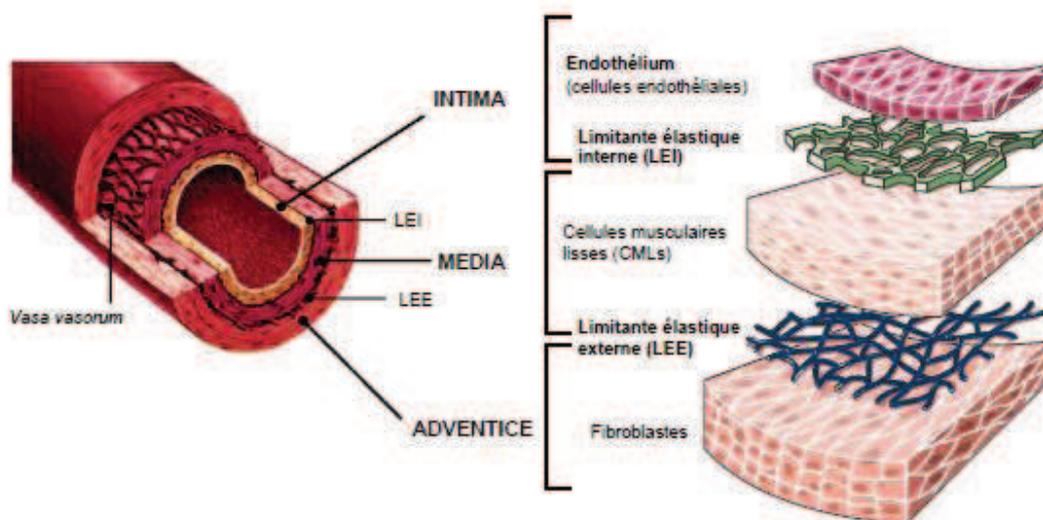


Figure 2 : Structure de l'artère normale de moyen et gros calibre. Elle est constituée de 3 couches : intima, média et adventice.

1.3 Physiopathologie de l'athérosclérose

Actuellement, on peut affirmer que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique après avoir été longtemps considérée simplement comme une accumulation de lipides dans les parois vasculaires [5]. Les cellules qui interviennent dans la formation des plaques sont hétérogènes, comme les cellules endothéliales, les CML, les cellules de l'immunité innée et les lymphocytes [6]. Elles participent aux différentes étapes pour contribuer à l'athérosclérose.

1.3.1 Modèles animaux

L'étude d'athérosclérose in vivo chez l'homme est souvent difficile pour des raisons éthiques. C'est pour cette raison que des modèles expérimentaux ont été développés. Tout au début, les études étaient faites chez le lapin [7] mais d'autres modèles ont également été utilisés comme le porc et le chien [8]. Les modèles de souris sont maintenant les plus utilisés parce qu'ils sont économiques, faciles et rapides à obtenir. Les souris ayant des taux élevés de HDL (high density lipoprotein) et faibles taux de LDL (low density lipoprotein) et VLDL (very low density lipoprotein) sont résistantes à l'athérosclérose. Par contre, des manipulations génétiques ont permis d'avoir des modèles athéromateux par invalidation du gène *ApoE* [9] ou *Ldlr* (récepteur aux LDL) [10]. Le développement d'athérosclérose est ensuite favorisé et accéléré par un régime alimentaire riche en lipides (figure 3) [8].

L'apolipoprotéine E est une glycoprotéine jouant un rôle dans le transport et le métabolisme des lipides dont l'absence provoque une hypercholestérolémie et formation des lésions athérosclérotiques. Les lésions murines sont similaires aux lésions humaines [8]. Les souris *Ldlr*^{-/-} se comporte pareillement aux souris *ApoE*^{-/-} et développent des lésions identiques à celles de l'homme [10]. Ces modèles ont aidé à disséquer et comprendre les mécanismes impliqués dans l'athérosclérose humaine. Néanmoins, les différences anatomiques, métaboliques et au niveau d'expression des gènes empêchent l'extrapolation de la totalité de ces résultats à l'humain. Ces bons modèles de l'évolution des lésions ne permettent cependant pas d'étudier la rupture des plaques et toutes les complications de l'athéro-thrombose [11].

Récemment, des travaux ont validé des modèles de thrombose induites par différents agents et facteurs (laser argon, actions photochimiques) même chez des souris *Apoe*^{-/-} [11].

Bien que les systèmes immunitaires humain et murin se ressemblent, il existe aussi des différences importantes. Les neutrophiles sont la population majeure circulante dans le sang humain tandis que le sang murin est plus riche en lymphocytes. Ces derniers caractérisés par des marqueurs de surface qui peuvent avoir, chez l'homme, des fonctions différentes de celles observées chez la souris. Il est encore possible que le développement progressif spontané de l'athérosclérose stimule, chez la souris et chez l'homme des populations différentes [12].

Toutefois, ces modèles ont permis de mieux comprendre les mécanismes pathologiques et de déterminer le rôle spécifique des différents types cellulaires, surtout ceux du système immunitaire. Le choix du modèle est critique et l'extrapolation des résultats à la pathologie humaine doit être faite avec prudence.

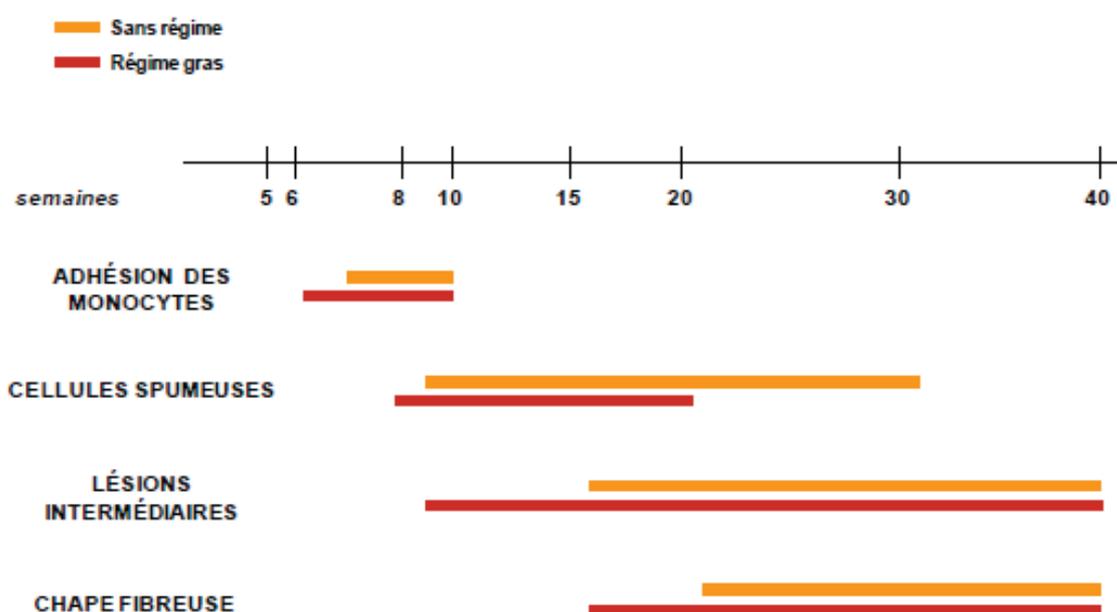


Figure 3 : Chronologie du développement des lésions chez les souris *Apoe*^{-/-}. Le régime gras accélère le développement d'athérosclérose chez les souris *Apoe*^{-/-}.

1.3.2 Mécanisme de l'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par l'infiltration des cellules immunitaires dans les parois artérielles dès les phases précoces [6]. Le système immunitaire contribue au processus pathologique par ses deux branches : l'immunité innée comme les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes, les neutrophiles... et l'immunité adaptative par l'intermédiaire des lymphocytes T et B [13].

1.3.2.1 Infiltration de lipoprotéines

L'étape initiale de cette maladie est l'infiltration des LDL dans l'intima. Leur petite taille facilite leur pénétration endothéliale. Des études in vitro ont montré le profil athérogène et les propriétés pathogéniques des particules LDL. Elles sont clairement associées aux maladies cardiovasculaires et métaboliques [14].

La formation des stries lipidiques a été bien décrite dans l'aorte du fœtus. L'étude, *In utero*, montre que l'accumulation lipidique pourrait avoir lieu en absence des macrophages mais pas l'inverse. Les dépôts lipidiques de LDL natives sont exclus des macrophages.

Une fois accumulées, les LDL s'oxydent, générant ainsi des réactifs indispensables à la formation des plaques d'athérome. Ces modifications des LDL se font par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques dans les parois artérielles [15]. L'oxydation des LDL est une succession de plusieurs changements locaux dans la paroi artérielle (*In situ*) [16]. Ces remaniements empêchent la reconnaissance des LDL par leurs récepteurs spécifiques mais leurs permettent de se lier aux récepteurs scavengers SRA et CD36 [17].

Bien que les LDL soient faiblement détectées dans le plasma, elles sont majoritaires dans les plaques sous forme oxydées [18].

1.3.2.2 Activation endothéliale

Physiologiquement, les cellules endothéliales résistent à l'adhésion des cellules immunitaires mais elles peuvent être modulées par différents facteurs tels que le diabète, l'obésité, l'hypertension, le tabac...[19]. En plus des LDLox, des facteurs physiques peuvent activer les cellules endothéliales. Des études ont démontré que les turbulences du flux sanguin et les faibles forces de cisaillement favorisent la formation des plaques d'athérome qui se développent donc préférentiellement au niveau des zones de bifurcation [20].

Suite aux altérations de l'intima, les cellules endothéliales expriment plusieurs types de molécules d'adhésion et de chimiokines qui permettent le recrutement et l'adhésion des monocytes et leucocytes circulants. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) ou ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) sont les plus connues pour se lier à des ligands de la famille intégrines présents sur la membrane de leucocytes [21, 22]. La fixation (rolling) des leucocytes sur l'endothélium résulte de l'interaction de la P-sélectine endothéliale avec PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) cellulaire (monocytes, neutrophiles et leucocytes). L'inactivation de la P-sélectine (de même que celle de l'E-sélectine) inhibe l'infiltration des macrophages et réduit la taille des lésions artérielles [23]. La double déficience en E- et P-sélectine réduit de 80% la taille des plaques précoces [24]. Les molécules d'adhésion VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) et ICAM-1 (inter cellular adhesion molecule) stabilisent l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium. Un déficit en ICAM-1 diminue la taille des lésions chez les souris *Ldlr*^{-/-} [25].

1.3.2.3 Recrutement des monocytes

Après leur adhésion, les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial suite à un gradient de la chimiokine monocyte chemokine protein-1 (MCP-1) libérée par les cellules endothéliales. Ensuite, les CML expriment du M-CSF (monocyte-colony stimulating factor) qui induit la différenciation des monocytes en macrophages. Les monocytes murins sont classés en deux catégories selon leur niveau d'expression du récepteur de chimiokines CX3CR1, des molécules de surface Ly-6c et Ly-6G et de l'antigène de différenciation myéloïde Gr-1 [26]. Ils peuvent infiltrer les sites inflammatoires et se différencier en macrophages et, à moindre degré, en cellules dendritiques [19]. Le rôle pro-athérogène des monocytes a été confirmé par leur déplétion qui entraîne la diminution de la formation des plaques chez le lapin [27]. Pourtant, la population monocyttaire Ly-6C^{Hi}, population sanguine

majeure sous un régime hypercholestérolémiant, était la seule capable de coloniser les plaques d'athérome [28]. Ces monocytes Ly-6C^{Hi} expriment plus des cytokines pro-inflammatoires et des protéases.

La contribution de nombreux récepteurs de chimiokines impliqués dans le recrutement monocytaire a été évaluée. Chez les souris *ApoE*^{-/-}, la délétion de CX3CR1 (récepteur de fractalkine) diminue de 32% la taille des lésions [29] ainsi que la double mutation CX3CR1^{-/-} MCP-1^{-/-} réduit de 67% la taille des lésions. Cette réduction atteint 90% lors de l'inactivation simultanée de CCR5, MCP-1, CXCR3 [30]. Cependant, ces résultats ne sont pas valables chez l'homme dont les monocytes n'ont pas l'antigène Ly-6C (figure 4).

Il y a deux populations monocytaires chez l'homme: CD14^{high} CD16^{low} (population majeure du sang) et CD14^{low} CD16^{high}. Elles se caractérisent également par l'expression de récepteurs des chimiokines et de molécules d'adhésion [31]. Ensuite, les monocytes se différencient, sous l'effet du M-CSF, en macrophages [32].

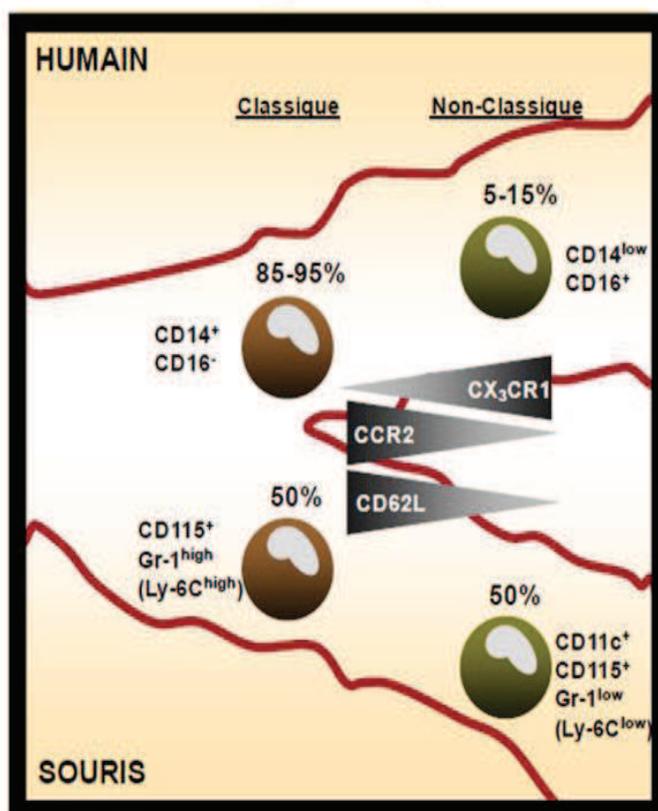


Figure 4 : Type de monocytes humains et murins [33]. Les monocytes humains (CD14, CD16) ont des marqueurs de surface différents de ceux des populations monocytaires murines (Ly-6c, Gr-1).

Molécules	Etudes	Effets sur lésions chez les souris <i>Ldlr</i> ^{-/-} ou <i>ApoE</i> ^{-/-} (% <i>Ldlr</i> ^{-/-} ou <i>ApoE</i> ^{-/-})	Références
Molécules d'adhésion	Sélectine P ^{-/-}	Diminution de 2 fois	(Collins, Velji <i>et al.</i> , 2000)
	Sélectine E ^{-/-}	Diminution de 1,3 fois	(Collins, Velji <i>et al.</i> , 2000)
	ICAM ^{-/-}	Diminution de 1,4 fois	(Collins, Velji <i>et al.</i> , 2000)
Facteur de croissance	M-CSF ^{-/-}	Diminution de 5 fois	(Smith, Trogan <i>et al.</i> , 1995)
Chimiokines	CCR2 ^{-/-}	Diminution de 3 fois	(Boring, Gosling <i>et al.</i> , 1998)
	MCP-1 ^{-/-}	Diminution de 5 fois	(Gu, Okada <i>et al.</i> , 1998)
Récepteurs scavengers	CD36 ^{-/-}	Diminution de 4 fois	(Febbraio, Podrez <i>et al.</i> , 2000)
	SRA ^{-/-}	Diminution	(Suzuki, Kurihara <i>et al.</i> , 1997)

Tableau 1 : Effet du déficit en facteurs d'adhésion sur la formation des stries lipidiques [34].

Toute inhibition du recrutement ou de la différenciation des monocytes inhibe le développement des lésions d'athérosclérose.

1.3.2.4 Rôle des macrophages et formation des cellules spumeuses

Les macrophages de l'espace sous endothélial jouent un rôle pathogène dans l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose. Ils participent au métabolisme du cholestérol, à la formation du core lipidique et à la production des cytokines pro-inflammatoires dans l'intima [13]. La délétion du gène du M-CSF empêche le développement d'athérosclérose, même avec des taux élevés de cholestérol, ce qui prouve l'indispensabilité de ces cellules [32]. Il y a 2 types de macrophages : M1 connus comme des cellules inflammatoires et M2 anti-inflammatoires. Ces deux populations avec leurs effets paradoxaux sont présentes dans les plaques d'athérome [35].

Dans un premier temps, les macrophages se transforment en cellules spumeuses en captant des LDL oxydées par l'intermédiaire des récepteurs scavengers (SR-A1, SR-A2,...). Cette internalisation non contrôlée conduit à la formation de stries lipidiques. Les lipides intracellulaires se mélangent aux extracellulaires pour former un amas appelé cœur lipidique de la plaque. Ce dernier est protégé par une chape fibreuse, riche en CML et collagène, qui l'isole de la lumière artérielle. La totalité de cette chape contrôle la stabilité de la plaque d'athérome [36, 37]. Les souris déficientes en récepteurs scavengers SR-A et CD-36 sont

résistantes à l'athérosclérose [38]. Par contre, Moore et al., ont observé des effets inverses, lors de la déplétion de SR-A et CD36, marqués par l'augmentation de la taille des lésions et la formation de cellules spumeuses. Ces différences peuvent être dues aux différents stades de l'athérosclérose dans les 2 études [39].

Ces cellules néoformées sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-12,...) et induisent également l'expression de métallo-protéases matricielles et de produits oxygénés. Ces produits macrophagiques amplifient l'activation endothéliale et fragilisent les plaques [40].

Les effets de l'apoptose des macrophages varient en fonction du stade de la maladie. Dans les lésions précoces, l'apoptose des macrophages est associée à une diminution de la taille des lésions cellulaires. Cependant elle a, dans les lésions avancées, un effet pro inflammatoire dû à un déficit de clairance des débris apoptotiques [41, 42]. Ce résultat a été parallèlement confirmé et validé par deux autres approches chez les souris *Ldlr*^{-/-} soit en invalidant le gène pro-apoptotique Bax [43], soit en surexprimant le gène anti-apoptotique Bcl-2 (B-Cell Lymphoma-2) [44]. Les LDLox et les lipopolysaccharides (LPS) peuvent stimuler les TLR (Toll-Like Receptor) des macrophages et les cellules endothéliales [45]. Ces macrophages, en plus des cellules dendritiques, présentent les antigènes et stimulent les cellules de l'immunité adaptative.

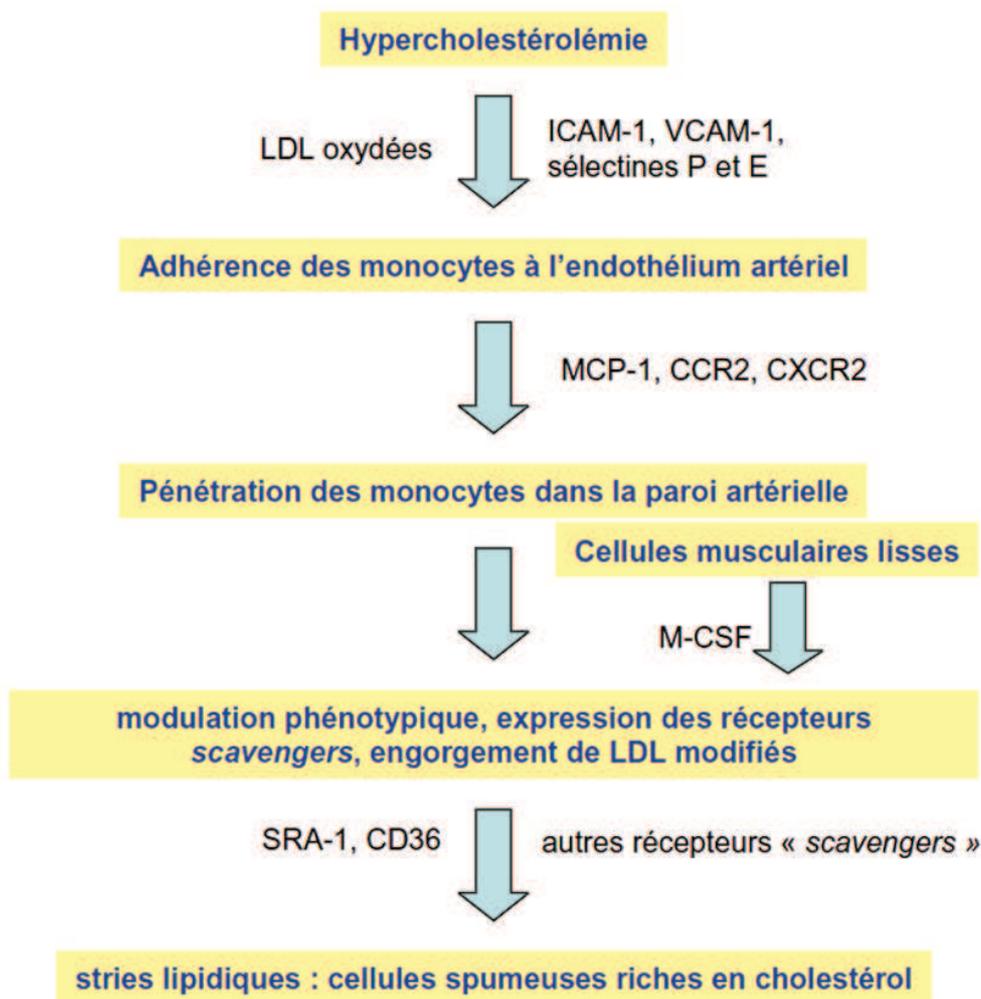


Figure 5 : Mécanisme et chronologie de la formation des stries lipidiques.

1.3.2.5 Les cellules dendritiques

Ces cellules, connues comme cellules présentatrices d'antigènes, peuvent activer les cellules T naïves. Elles ont la capacité de stimuler la réponse immunitaire et contrôler l'immunos tolérance [46, 47].

Bobryshev et Lord ont été les premiers à décrire la présence de cellules dendritiques (CD) dans les artères humaines par des études histochimiques et morphologiques [48-50]. Les études histologiques dans les plaques d'athérosclérose se confrontent à différents problèmes techniques liés à l'utilisation des marqueurs classiques des cellules dendritiques. Par exemple, les marqueurs CD11c et CD123 utilisés pour repérer les cellules dendritiques sanguines sont également exprimés sur les monocytes, les macrophages (CD11c) et les cellules endothéliales (CD123). Il en va de même pour plusieurs autres marqueurs exprimés par d'autres cellules. En outre, les molécules CD83 et BDCA (Blood dendritic cell antigen) peuvent être détectées dans les plaques humaines [51]. Actuellement le marqueur S100 est le marqueur général le plus relevant des CD dans les plaques mais pas dans l'adventice où il marque par défaut les nerfs. Le marqueur fascin peut donner également des bons résultats dans les lésions précoces avant la néo-angiogenèse [52].

Cependant, il n'y a pas de marqueur réellement spécifique aux CD. Tout marqueur caractéristique comme fascin ou S100 indique la présence d'un type particulier de CD mais n'identifie pas toutes les cellules comme le ferait la microscopie électronique [48, 49, 51].

Les précurseurs de cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes sont détectés dans les artères coronaires athéromateuses (adventice et plaque). Leur localisation autour des micro vaisseaux suggèrent leur recrutement à partir du sang [51]. Les cellules dendritiques S100+ et fascin+ se présentent dans les artères normales ainsi que dans les lésions artérielles à différents stades [51, 53-55]. La présence de CD dans l'espace sous endothélial à proximité de l'intima, même dans les artères normales des enfants [56, 57], indique qu'elles sont impliquées dans la formation des VALT (vascular associated lymphoid tissue) contenant différentes cellules du système immunitaire [58, 59].

L'accumulation des CD dans l'intima dépend de VCAM-1 et CX3CR1 [60]. Le nombre des CD augmente avec la progression de la maladie. Elles se retrouvent, dans les sites de rupture, en contact avec les lymphocytes T suggérant leur participation à la modulation de ces lymphocytes [54]. Les cellules dendritiques ont aussi des effets métaboliques qui compliquent l'étude de leur rôle immunologique. La prolongation de la survie des CD, grâce à la surexpression de Bcl-2, montre une augmentation de l'activité des cellules T sans moduler ou accélérer la progression des lésions. De manière intéressante, il existe parallèlement une diminution du taux plasmatique du cholestérol qui neutralise l'effet de l'augmentation de l'inflammation [61].

1.3.2.6 Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont impliqués dès les premières étapes de l'athérosclérose murine [13]. Les cellules immunitaires recrutées pénètrent dans l'espace sous-endothélial par diapédèse régulée par un gradient de chimiokines [62]. Les facteurs MCP-1, M-CSF, I-TAC (interferon inducible T-cell alpha chemoattractant), IP-10 (inductible protein-10) et mig (monokine induced par IFN- γ) sont des chimiokines impliquées dans le recrutement des

lymphocytes T. Toute interruption de ce chimiotactisme (du MCP-1 ou de son récepteur par exemple) entraînait une diminution significative du développement des plaques [63, 64]. Des résultats similaires ont été observés lors de l'inactivation d'autres chimiokines (IP-10, MIG, I-TAC) [65, 66].

Les lymphocytes présents dans les plaques sont surtout des lymphocytes T CD4⁺ dont la majorité possède un TCR $\alpha\beta$ (récepteur des cellules T). La présence de LT CD4⁺ a été signalée dès les stades précoces chez les souris (10 à 20 % des cellules totales) [67]. Robertson et al., ont étudié le rôle des lymphocytes dans l'athérosclérose. Pour cela, ils ont croisé des souris immuno-déficientes (inactivation de Recombination Activating Genes : RAG1^{-/-}, RAG2^{-/-}) avec des souris *ApoE*^{-/-} ou *Ldlr*^{-/-}. Ce type de souris montre une diminution de 90% de la taille des lésions due à l'absence des lymphocytes [68]. Dansky et al., ont également observé une réduction de l'athérosclérose chez les souris immuno-déficientes soumises à un régime normal. Par contre, des souris *ApoE*^{-/-} RAG2^{-/-} soumises à un régime gras développaient autant de lésions que les souris contrôles *ApoE*^{-/-}. Cette contradiction pourrait être due à la différence de régime dans les 2 études.

En plus le transfert des LT CD4⁺, par injection intraveineuse, à ces souris immuno-déficientes provoque une augmentation significative des lésions aortiques [69] confirmant le rôle pathogène des lymphocytes T CD4⁺. Parmi les LT CD4⁺, on distingue les cellules Th1, Th2 (provenant d'un même précurseur T0), Treg et Th17 (figure 6).

Cellules Th1

Les LT CD4⁺ sont essentiellement de type Th1 dans les lésions athérosclérotiques. Chez les sujets atteints d'angor instable, les LT activés produisent surtout de l'IFN- γ [70]. On note une diminution de 60 % de la taille des lésions d'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} invalidées pour le gène du récepteur de l'IFN- γ . Il semble que l'IFN- γ est responsable des effets majeurs de la voie Th1 [71]. La production de cette cytokine conduit à l'activation des macrophages et des cellules endothéliales, la production de protéases et de molécules inflammatoires, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion d'une part et à une inhibition de la prolifération des CML et de la production de collagène d'autre part [72].

De nombreux facteurs impliqués dans la voie Th1 peuvent contribuer à la progression de l'athérosclérose. Par exemple, l'IL-12 est un autre acteur qui participe à la fois à la différenciation en Th1 et au processus pathogénique [73]. Davenport et al., ont démontré que la déficience en IL-12 chez les souris *ApoE*^{-/-} est associée à une diminution des lésions d'athérosclérose [74]. De plus, la neutralisation de l'IL-12 ou l'IL-18 réduit la taille des lésions vasculaires révélant un rôle athérogène des cellules Th1 [20, 74, 75]. L'injection d'IL-12 confirme son effet athérogène [76]. Par ailleurs, l'IL-18, connue comme facteur pro athérogène, induit la production d'IFN- γ et l'augmentation des lésions athéromateuses chez les souris *ApoE*^{-/-}. Cet effet pathogénique disparaît cependant chez les souris déficientes en IFN- γ ^{-/-} [77]. L'analyse des plaques d'athérome humaines montre la présence de l'IL-18 dont l'expression augmente surtout au cours des phases symptomatiques [78, 79]. Enfin, le taux plasmatique d'IL-18 est considéré comme un facteur pronostic des maladies cardiovasculaires [80, 81]. En outre, l'absence du facteur de transcription T-bet, responsable de la différenciation Th1 et de la régulation de la balance Th1/Th2, réduit la taille des lésions et leur contenu en CML. Elle favorise une commutation vers une réponse Th2 [82].

Cellules Th2

Contrairement aux cellules Th1, les cellules Th2 ont été d'abord considérées comme protectrices en se fondant sur la réponse humorale, surtout IgM, favorisée par l'orientation Th2. La splénectomie induit une augmentation des lésions associée à une diminution des taux d'anticorps anti-LDLox de type IgM [83]. Un titre élevé de ces anticorps réduit la taille des plaques d'athérosclérose [84, 85]. Ces anticorps sont sécrétés par les lymphocytes B

Les lymphocytes Th2 secrètent de l'IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et stimulent les lymphocytes B [86] dont le rôle controversé sera discuté plus bas.

La voie Th2 est favorisée par la sécrétion de cytokines prototypiques (IL-6 et IL-4). Elle inhibe la voie Th1 et pourrait avoir un rôle anti-athérogène. Binder et al., ont validé cet hypothèse en montrant que l'orientation Th2 est accompagnée d'une diminution des lésions ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'anticorps naturels anti-LDLox protecteurs. Cette sécrétion est dépendante de l'IL-5 [73]. Cependant, des études originales ont montré que les Th2 ne sont pas forcément associées à un rôle protecteur et anti-athérogène [87]. Ces travaux récents mettent en évidence le paradoxe de l'orientation Th2 en lui attribuant un rôle pathogénique. L'IL-4, facteur clé de la voie Th2, a été détectée dans les lésions humaines et murines. La déficience en IL-4 réduit la taille des lésions au niveau du sinus aortique mais également au niveau de la crosse aortique chez les souris femelles *Ldlr*^{-/-} [88]. Le transfert d'une moelle osseuse déficiente en IL-4 inhibe l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} irradiées.

L'IL-4, *in vitro*, induit l'expression endothéliale de VCAM-1 et MCP-1 qui permettent le recrutement et l'adhésion des cellules inflammatoires [74]. Ces études rapportent un effet athérogène de l'IL-4 et de la voie Th2.

L'effet du Th2 sur les maladies cardiovasculaires humaines a été mis en évidence chez les patients asthmatiques caractérisés par une déviation de type TH2 des réponses immunes qui ont un risque d'atteinte cardiovasculaire supérieure à celui des patients non asthmatiques [89]. En conclusion, les voies Th1 et Th2 ne sont pas tout à fait opposées.

Cellules T régulatrices

La population T régulatrice (Treg) a été récemment impliquée dans la physiopathologie de l'athérosclérose. La dysfonction lymphocytaire (Th1, Th2) est souvent due à un défaut de ces cellules Treg [90]. Cette population immunosuppressive inhibe la réponse Th et T cytotoxique. Les Treg identifiées initialement dans certaines maladies auto-immunes, jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la tolérance au soi [91, 92]. Le déficit d'activation ou de formation de Treg était bien lié à l'apparition des maladies auto-immunes comme l'arthrite, l'encéphalomyélite, la myocardite, la thyroïdite, le diabète et la myasthénie [92].

On peut distinguer deux sous types de lymphocytes T reg : Tr1 induit par l'IL-10 et Th3 induit par le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) [93]. La famille Treg comporte alors : 1-les Treg naturels CD4⁺CD25⁺ (thymus) qui expriment intensément la molécule CD25 membranaire et le facteur de transcription FoxP3 et secrètent faiblement des cytokines [94].

2-les Treg adaptatifs Tr-1 ou Th3. Les Tr-1 secrètent surtout d'IL-10, peu d'IL-4 et d'IFN- γ alors que les cellules Th3 secrètent du TGF- β [95].

L'administration des faibles doses antigéniques par voire intra-nasale génère des cellules Tr-1 [96, 97] tandis que la voie orale (muqueuse digestive) induit des lymphocytes Th3 [98].

L'inactivation génétique du TGF- β ou de l'IL-10 augmente la taille des lésions avec une infiltration plus importante des cellules inflammatoires chez les souris [5, 99, 100]. Le déficit

en IL-10 déclenche la formation des lésions précoces chez les souris C57BL/6 nourries avec un régime riche en graisse [99, 101]. Il induit une déviation Th1 de la réponse immunitaire, associée à une accumulation accrue des cellules inflammatoires dans les lésions vasculaires des souris *Ldlr*^{-/-}. Ces résultats suggèrent que l'IL-10 inhibe la formation des lésions et la progression de l'athérosclérose [102]. De façon intéressante, la surexpression de l'IL-10 dans les LT activés aboutit aux mêmes effets protecteurs chez les souris *Ldlr*^{-/-}. De plus, ces LT inhibent l'activation des monocytes et l'apoptose des macrophages [103]. Cependant, chez ces souris transgéniques, cet effet protecteur de l'IL-10 est vraisemblablement attribué aux cellules Tr1 et pas à une réponse Th2 [104-106].

L'IL-10 est présente dans les plaques d'athérosclérose humaines et son taux plasmatique est prédictif d'événement cardiovasculaire chez les coronariens. Les patients atteints d'un syndrome coronarien aigu ont un taux plasmatique d'IL-10 plus faible que les individus en angor stable. La surexpression locale d'IL-10 est corrélée à une diminution de l'inflammation et de la mort cellulaire [107-109].

De même que l'IL-10, le TGF- β a des effets anti-inflammatoires surtout sur les CML [110]. La souris déficiente en TGF- β 1, soumise à un régime riche en cholestérol, meurt rapidement à cause d'une inflammation non contrôlée qui atteint souvent le cœur et les poumons [111-113]. Mallat et al., ont étudié le rôle du TGF- β dans l'athérosclérose chez les souris *Apoe*^{-/-}. La neutralisation du TGF- β 1, TGF- β 2 ou TGF- β 3 aggrave l'athérosclérose et enrichit les lésions en cellules inflammatoires [114]. La perturbation de la signalisation du TGF- β génère les mêmes effets chez les souris *Apoe*^{-/-} [115, 116]. Tous ces résultats suggèrent un rôle protecteur et anti-athérogène du TGF- β . Ces effets du TGF- β sont probablement liés à sa signalisation spécifique intracellulaire au niveau des cellules T [117, 118].

La transplantation de moelle osseuse mutée pour le récepteur type II du TGF- β exclusivement dans les cellules T à des souris *Ldlr*^{-/-} favorise la différenciation des cellules T de la rate en Th1 et Th2 [117]. De plus, ce transfert augmente l'infiltration intimale des cellules T et inhibe la production du collagène par les CML. L'invalidation génétique du récepteur du TGF- β chez les souris *Apoe*^{-/-} est marquée par des lésions importantes et une augmentation de la production d'IFN- γ et d'IL-4 dans les plaques d'athérosclérose et dans la rate [118, 119].

Le TGF- β est donc une cytokine protectrice et stabilisatrice de la plaque d'athérome [119]. Aux stades avancés de l'athérosclérose, les patients ont un faible taux sérique de TGF- β [120]. Les effets anti-athérogènes des deux cytokines (IL-10 et TGF- β) et leur caractère indispensable au fonctionnement des Treg suggèrent un rôle protecteur de ces cellules dans la progression de la maladie.

Mallat et al., ont essayé de discriminer l'effet de chaque sous population de Treg (Tr1 et Th3). Ils ont prouvé le rôle protecteur des Treg de type Tr1 chez les souris *Apoe*^{-/-}. L'administration des cellules Tr1 anti-ovalbumine inhibe la réponse immunitaire (Th1 et Th2) et réduit la taille des lésions d'athérosclérose chez les souris *Apoe*^{-/-}. D'autre part, une augmentation significative de la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T spléniques anti-ovalbumine était détectée chez ces souris. Ces résultats montrent que ces Tr1 inhibent l'inflammation indépendamment de la spécificité antigénique. Cet effet est plutôt dû à l'immunosuppression non spécifique des cytokines anti inflammatoires (IL-10) secrétées par les lymphocytes Tr1 activés anti-ovalbumine [104].

Le rôle des Treg naturels a été élucidé dans différents modèles murins. L'injection de splénocytes sans Treg à des souris *Apoe*^{-/-} RAG2^{-/-} (dépourvues de lymphocytes T et B)

aggrave les lésions aortiques tandis que le transfert de lymphocytes Treg stabilise les plaques et réduit le nombre des cellules inflammatoires dans les lésions. Ce transfert dévie et détourne la réponse inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire. Quoique le ciblage des cellules Treg naturelles accélère la progression de la maladie vasculaire, leur déplétion n'a aucun effet dans les animaux insensibles au TGF- β [5].

Ces résultats semblent aussi être valables chez l'homme. Une diminution importante des Treg était signalée chez les patients atteints d'un accident cardiovasculaire aigu en comparaison avec ceux ayant des plaques stables [121].

Cellules Th 17

Cette population est repérée par sa propre sécrétion d'IL-17. Elle est bien connue dans la défense contre les bactéries extracellulaires et les champignons [122-124]. Elle est aussi impliquée dans plusieurs maladies auto-immunes comme l'arthrite, la sclérose en plaques et le psoriasis [125]. La majorité des études attribue un rôle pro-inflammatoire à l'IL-17 qui active le facteur NF- κ B et induit l'expression des cytokines inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF- α [126].

Cependant, les cellules Th17 ont une production cytokinique dépendante du contexte. L'induction de l'IL-17 dans un environnement anti inflammatoire a des effets bénéfiques. Par exemple, la formation de Th17 en présence d'IL-6 et du TGF- β génèrent des cellules produisant à la fois de l'IL-17 et de l'IL-10 [127]. Ce rôle protecteur de Th17 a été révélé dans les cas d'asthme [128], de colite [129] et d'uvéite [130].

Le rôle des cellules Th17 dans l'athérosclérose n'est pas bien connu et les quelques études faites semblent paradoxales [67]. Des cellules T artérielles exprimant simultanément l'IFN- γ et l'IL-17, ont été détectées chez les patients coronariens. Elles sont pathogènes et amplifient l'inflammation [131]. Les souris *Ldlr*^{-/-} *IL6*^{-/-}, qui ont aussi une diminution d'IL-17, montrent une faible réduction des lésions suggérant ainsi un rôle secondaire des cellules TH17 dans l'athérosclérose [132, 133]. La transplantation de moelle osseuse déficiente en récepteur d'IL-17 à des souris *Ldlr*^{-/-} irradiées inhibe la formation des plaques et le développement des lésions par rapport aux souris reconstituées par une moelle osseuse normale [134]. Cette étude se confronte à l'expression ubiquitaire du récepteur d'IL-17 surtout sur les CML et endothéliales des souris receveuses. De plus, la neutralisation de l'IL-17 réduit l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} [135]. Ces effets dépendent de l'anticorps utilisé [136]. Cependant, aucune donnée n'a été fournie sur la demi-vie de l'anticorps ni sur le degré d'inhibition de la signalisation de l'IL-17 sur le long terme [135, 137]. Toutefois, ces études indiquent un rôle pro-athérogène des cellules TH17.

Pourtant, une étude récente a signalé un rôle protecteur de l'IL-17. Soraya et al., ont trouvé que l'hyperactivation de STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) dans les LT CD4⁺ induit leur sécrétion d'IL-17 et d'IL-10 chez les souris *Ldlr*^{-/-}. L'injection d'IL-17 confirme ce résultat en réduisant la taille des lésions vasculaires. De manière intéressante, la neutralisation de l'IL-17 aggrave la maladie [138].

Bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre la concentration sérique d'IL-17 et les événements cardiovasculaires, son expression locale élevée dans les lésions a été associée à la stabilité de la plaque [138]. L'effet de des cellules Th-17 nécessite des recherches plus approfondies et son rôle dans l'athérosclérose reste encore à déterminer.

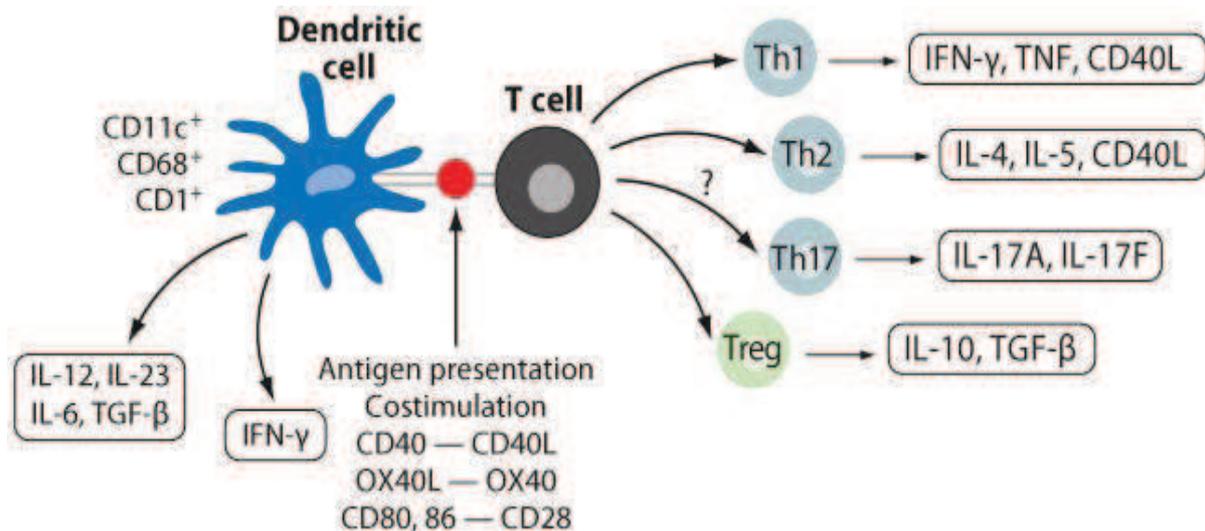


Figure 6 : Polarisation de cellules T dans l'athérosclérose [13].

1.3.2.7 Stades avancés et compliqués - Progression des plaques

La balance cellules inflammatoires/CML est un facteur déterminant de la stabilité des plaques. Les plaques instables contiennent plus de cellules inflammatoires et une chape mince, tandis que les plaques stables ont une couche épaisse de chape fibreuse constituée de CML et de matrice extra-cellulaire (MEC) [139].

Les lésions non sténosantes sont asymptomatiques et difficiles à détecter par angiographie. Ces plaques, ayant un gros cœur lipidique et une mince chape fibreuse, ont subi un remodelage vasculaire externe [140, 141]. Ces plaques ont un risque de rupture très élevé et représentent 70% des plaques rompues [142].

Lors de la progression d'athérosclérose, le taux de cellules inflammatoires augmente, favorisant ainsi l'instabilité et la rupture des plaques. Les macrophages jouent un rôle clé dans la fragilisation des plaques en sécrétant des MMP (Métalloprotéases Matricielles) et en stimulant l'apoptose des CML. Cette induction d'apoptose nécessite l'interaction entre les molécules Fas-L membranaires des macrophages et les récepteurs Fas sur les CML. Les lymphocytes T n'ont aucun effet sur l'apoptose des CML [143].

Dans les stades avancés, l'excès d'apoptose conduit à une destruction partielle de la plaque, ce qui suggère une clairance inefficace des cellules apoptotiques. Cette perturbation de phagocytose résulte soit de l'internalisation des composés non digérables par les macrophages soit de la compétition entre les LDLox et les réactifs oxydés du sang [144]. Le déficit en clairance accélère la progression de la maladie vers des plaques vulnérables susceptibles à la thrombose et la survenue d'infarctus myocardiques [41]. Bien que les CML sécrètent constitutivement des TIMP (inhibiteurs tissulaires des MMP), elles peuvent également libérer des MMP (gélatinase, collagénase, stromelysin) sous l'effet de la stimulation par l'IL-1 ou le TNF-α. Ces cytokines, souvent sécrétées par les lymphocytes T, contribuent aussi à la diminution de la sécrétion du collagène [145, 146].

Toutes les cellules inflammatoires agissent simultanément pour provoquer la rupture des plaques. De plus, la majorité des cellules stimulent l'expression de facteur tissulaire par les CML et les macrophages [147].

Aux stades avancés, l'hémorragie intra-plaque, due à la rupture des petits néo vaisseaux fragiles, aboutit à la formation d'un thrombus. Néanmoins, la thrombine libérée au cours de ce phénomène peut activer les plaquettes pour libérer du PDGF (platelet-derived growth factor) et du TGF- β . Le PDGF stimule la migration et prolifération des CML tandis que le TGF- β renforce la production musculaire (CML) du collagène, favorisant ainsi la stabilité de la plaque. La rupture de la chape fibreuse reste l'événement le plus dangereux et le plus grave. Cette fissure met en contact le cœur thrombogène de la plaque avec le sang déclenchant ainsi l'agrégation plaquettaire et la coagulation du sang [147]. La thrombose peut être transitoire et spontanément résolutive (figure 7). Ce phénomène asymptomatique peut réduire partiellement le diamètre de l'artère conduisant au syndrome d'angine de poitrine instable. Pourtant, il progresse souvent jusqu'à l'occlusion complète de l'artère, aboutissant à une ischémie aigue (figure 7) [140, 141, 148, 149].

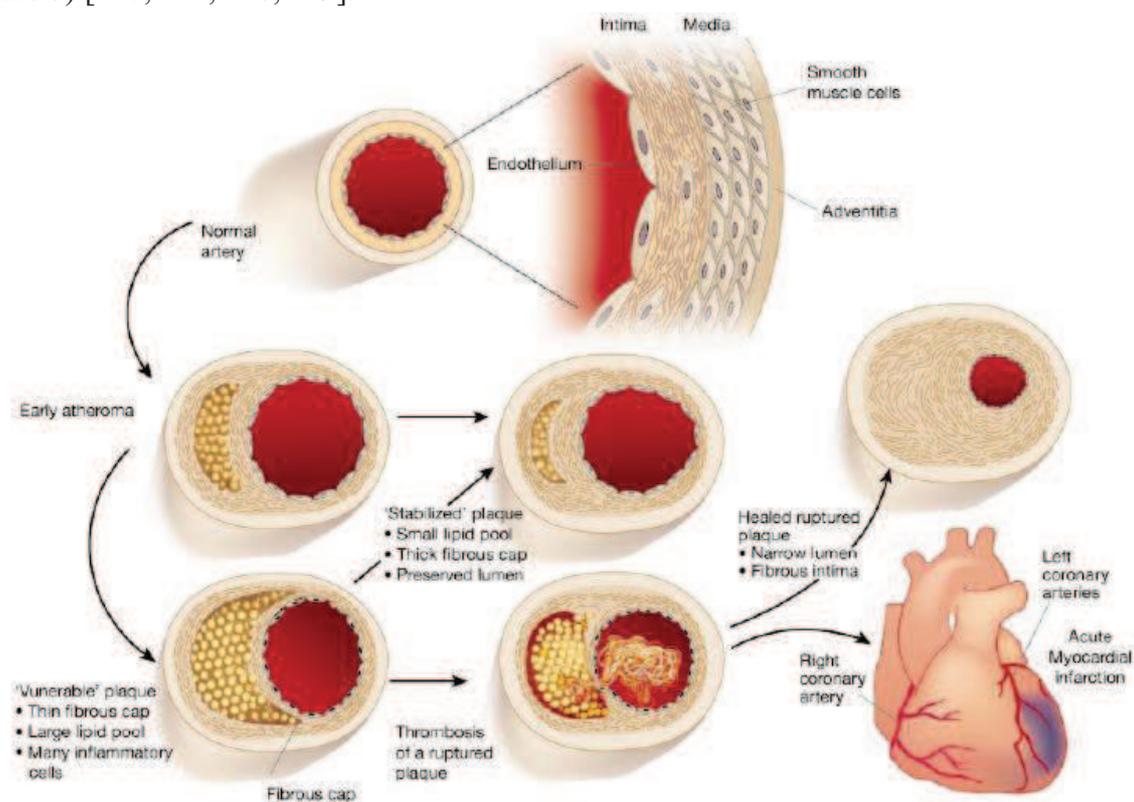


Figure 7 : Progression de plaque d'athérosclérose humaine [139].

1.3.2.8 Adventice et structure lymphoïde tertiaire

L'adventice a été considéré pendant longtemps comme un tissu nutritif qui ne participait pas à l'athérosclérose. Mais des études récentes ont mis en évidence son rôle et sa contribution active à cette pathologie [150, 151].

Au début, les investigations se sont intéressées aux vasa vasorum (vv) adventitiels qui semblent jouer un rôle important dans la progression et la déstabilisation des plaques (figure8). La prolifération des vasa vasorum est associée à la progression de la plaque ainsi qu'à l'inflammation [152]. Ces micro-vaisseaux sont plus denses dans le cas de plaques riches en lipides. Ils sont le siège d'une inflammation de proximité due à l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. Ces observations suggèrent que la néo-vascularisation adventitielle favorise la déstabilisation des plaques et maintient la migration des cellules inflammatoires [153]. De plus, des études faites sur le porc ont montré que l'occlusion du VV, sans affecter les autres couches, déclenche l'athérosclérose en stimulant la prolifération des

CML de l'intima [150]. Un régime riche en cholestérol, ainsi que l'hypertension, stimule et amplifie la néo-vascularisation adventitielle [154] avant toute modification ou perturbation intimale [155, 156]. Les fibroblastes adventitiels modulent les CML [157]. Chez l'homme, la néo-vascularisation est corrélée à la progression, à l'hémorragie et surtout à la rupture de la plaque [158, 159].

Cette couche est le siège d'une inflammation et d'accumulation de cellules immunitaires (figure8). Elle contient des TLR qui peuvent induire la formation et le remodelage d'une plaque suite à une stimulation [160]. Cette inflammation artérielle précède tout dépôt et accumulation lipidique chez l'homme [161]. Elle contribue à la progression des plaques et aux événements cardiovasculaires humains. 80% des plaques rompues ont une inflammation adventitielle qui persiste aussi chez 62% des plaques non rompues [159, 162]. L'adventice est connectée par un système nerveux autonome [163] qui participe à la destruction des organes [164], à l'inflammation et à la thrombose [165]. L'adventice contient différentes cellules immunitaires innées et adaptatives. L'analyse histologique montre la présence de cellules B, LT-CD8, LT-CD4 [161], macrophages [158] et de mastocytes [166]. Ces cellules existent dans l'adventice de l'artère normale non inflammatoire murine ou humaine ainsi que dans l'artère pathologique [167-169]. Les lymphocytes (B et T) sont recrutés à l'adventice des artères par un mécanisme L-sélectine dépendant [167]. L'infiltration des cellules immunitaires adventitielles est corrélée à l'instabilité des plaques [161].

Au contraire des cellules intimales, les cellules immunitaires murines sont organisées en VALT (Vascular Associated Lymphoid tissue) dans l'adventice [170]. L'anévrisme et l'athérosclérose partagent plusieurs caractéristiques communes dont la formation et l'organisation du VALT dans les parois artérielles humaines [169, 171]. La structure du VALT, similaire au centre germinatif (CG) [171], est centrée autour des lymphocytes B folliculaires (Les zones T entourent les follicules B) [172].

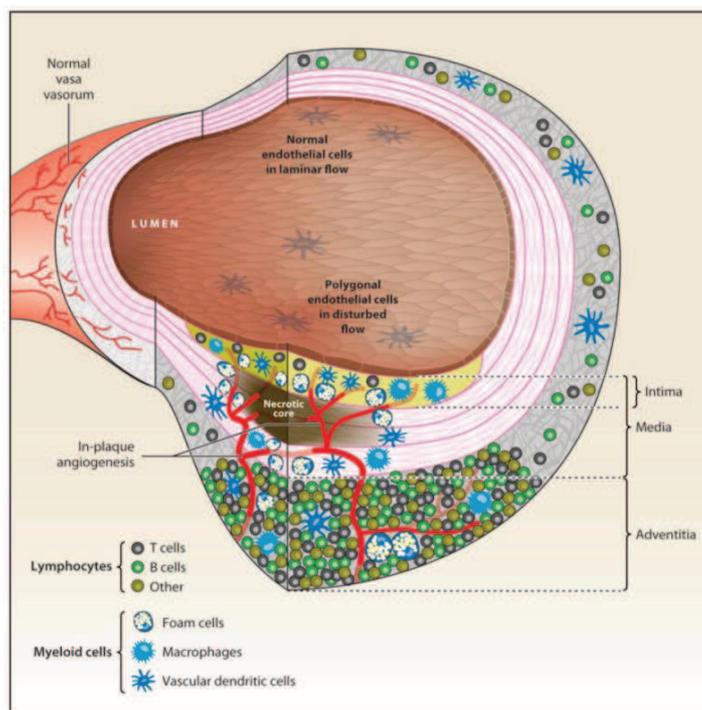


Figure 8 : Accumulation des cellules inflammatoires dans l'adventice [13].

En fait, la façon d'activer et de propager l'inflammation adaptative reste inconnue. La chronologie des étapes de l'athérosclérose est une problématique non résolue. Des études suggèrent que la stimulation de la réponse immune adaptative est indépendante des lésions de l'intima [173, 174]. Le VALT semble jouer un rôle important dans la réponse immunitaire locale à la fois cellulaire et humorale [48]. La formation de ces structures tertiaires se produit quand le système immunitaire n'arrive pas à éliminer les antigènes. Ces TLO (Tertiary Lymphoid Organs) amplifient la réponse immunitaire contre les antigènes locaux [175]. Une étude récente suggère que les LT sont préférentiellement recrutés dans les TLO des artères atteintes [170].

Le mécanisme de l'inflammation adventitielle du VALT humain et la nature des échanges intima-adventice restent encore mystérieux [171]. Cependant, Grabner et al., ont essayé de disséquer et comprendre ce mécanisme chez les souris *ApoE*^{-/-}. Ils ont trouvé que la lymphotoxine β (LT- β) entre en synergie et coopère avec le TNF-1A pour activer les CML qui, à leur tour, sécrètent CXCL13 et CCL21. Ces 2 chimiokines jouent un rôle important dans le recrutement des lymphocytes et l'organisation de l'ATLO. Cette structure se forme aux stades avancés (78 semaines) marqués par la surexpression des gènes impliqués dans le recrutement, maturation des LB et l'architecture du GC (*Cxcl13*, *Ccl21*, *Ltb*, *CCl21*). Le gène *Glycam-1* (Glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1), qui est impliqué dans le recrutement des LT, est exprimé exclusivement par l'endothélium des HEV (High endothelial Venules). En résumé, chez les souris *ApoE*^{-/-}, les CML soutiennent le développement et le maintien de l'ATLO par un mécanisme dépendant de la LT- β [170].

Les cellules mononuclées se domicilient de façon privilégiée dans l'intima au voisinage des sites où va se constituer le VALT [58]. Les infiltrats inflammatoires de l'intima et de l'adventice ont des compositions cellulaires distinctes. Cette différence résulte de l'absence de la migration cellulaire entre les deux couches [170]. A noter que les cellules du VALT existent dès l'enfance, mais elles ne sont activées qu'à partir de l'âge de 15 ans et acquièrent alors des propriétés pro-inflammatoires même chez les sujets asymptomatiques [57].

1.3.2.9 Participation des cellules B à l'athérosclérose

Les cellules B sont détectées dès les lésions précoces chez les souris [176, 177] mais seulement dans les phases avancées de l'athérosclérose humaine [178, 179]. Ces cellules sont surtout présentes dans l'adventice murine et humaine [176, 179].

Les cellules B murines du VALT sont CD19⁺ CD20⁺ à différents stades de maturation avec quelques plasmocytes occasionnels périphériques CD138⁺ [170]. Les LB CD20⁺ folliculaires sont organisés en CG entouré par un manteau de cellules B IgD⁺ [170]. Cependant, Zhou et al., ont signalé que le CD22, mais pas le CD19, est le bon marqueur des B adventitielles tout au long de la maladie chez les souris *ApoE*^{-/-}. De façon étonnante, le marquage CD19 ne détecte aucune cellule. Ceci peut être dû soit à l'absence du CD19, soit au masquage de ce marqueur et par suite l'inaccessibilité des anticorps [177]. Il existe donc une ambiguïté et une incertitude sur les marqueurs exprimés sur les cellules B résidentes.

L'analyse des lésions vulnérables humaines montre la prédominance des cellules B dans l'adventice par rapport à l'intima. Cependant, il n'y a pas de différence de composition cellulaire entre ces 2 couches d'artère dans les lésions stables. Par ailleurs, la proportion de cellules B adventitielles est associée à la progression de la maladie [180] et à la fragilisation

des plaques [161]. De même, les LB se concentrent et se focalisent dans l'adventice dans le cas d'anévrisme humain [181]. Ils expriment souvent d'IgG et à moindre degré d'IgM [182]. Ces lymphocytes B dominants forment des amas compacts au centre de l'infiltrat adventiciel [172] tandis qu'ils sont plutôt diffus et dispersés à la périphérie. La présence occasionnelle de plasmocytes a déjà été notée par quelques études morphologiques [161, 183] mais il n'y a pas d'étude par immuno-marquage pour la confirmer. Les plasmocytes sont détectés exclusivement dans les zones para-folliculaires en quantités variables [172]. Houtkamp et al., ont caractérisé les structures tertiaires humaines riches en cellules B folliculaires entourées par des cellules T. Ces LB sont : CD79a +, CD20+ et CD45A+ [170, 172]. L'analyse de différents marqueurs de cellules B (CD20 [172], CD19 [184], CD22 [185]) révèlent leur dominance à des stades avancés mais leur absence dans les stades précoces [58, 178, 186].

Les études histologiques ont aussi montré que les CD rentrent en contact avec les cellules B et T. Cette co-localisation des CD avec les lymphocytes suggèrent que l'activation lymphocytaire et la présentation antigénique sont des processus locaux (dans les parois artérielles). Schonbeck et al., ont suggéré que les LB sont indispensables à la stimulation CD40L pendant la progression de plaque [187]. Les LB folliculaires isolés des CG des maladies auto-immunes montrent une expansion clonale et une différenciation guidée par un antigène [188]. L'organisation des cellules B adventicielles en follicules [172] ainsi que l'analyse du répertoire des IgG des plaques humaines supportent l'hypothèse d'une expansion des LB guidée par un antigène [189]. Cependant, cet agrégat adventiciel est unique. Il est totalement différent des autres structures trouvées dans différentes maladies telles que la syphilis, l'artérite, l'aortite idiopathique et les infiltrats coronaires lors de l'arthrite rhumatoïde [183].

La déplétion des cellules B dans plusieurs maladies auto-immunes [diabète, Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), lupus, arthrite]) a permis de leur attribuer un rôle important dans la modulation de l'immunité cellulaire indépendamment de leur production d'anticorps [190, 191].

Les premières analyses histologiques ont trouvé des immunoglobulines (Ig) mais pas des cellules B dans les plaques humaines [192]. Pourtant, l'étude chez les lapins a montré la sécrétion des Ig par des plasmocytes présents dans les lésions [193]. L'IgM est répartie d'une façon similaire au marqueur CD22 mais l'IgG envahit toute la plaque. Ces résultats suggèrent que les IgM sont souvent secrétées par les LB locaux tandis que les IgG peuvent également être produites par les LB locaux et circulants (sanguins) [177]. Par contre, la présence des Ig était restreinte au voisinage des dépôts lipidiques dans l'adventice [194]

Les cellules B jouent un rôle important dans la modulation de la réponse immunitaire adaptative soit en sécrétant des anticorps et des cytokines, soit en régulant l'activation des cellules T. Au cours de l'athérosclérose, la participation de l'immunité humorale a été suggérée par l'augmentation des taux d'anticorps et d'immuns complexes (IC) dans le sérum (figure 9) [195]. Cependant les autres fonctions des cellules B n'étaient pas vraiment identifiées. Il en va de même de l'immunité humorale locale qui peut être totalement différente de l'immunité systémique.

Calgiuri et al. ont été les premiers à étudier le rôle des LB dans l'athérosclérose. Ils ont démontré que la splénectomie aggrave l'athérosclérose chez les souris *Apoe*^{-/-}. Cette

splénectomie était associée à une réduction des LB, des LT et des IgG anti-LDLox. Le transfert de la totalité des cellules spléniques ainsi que des cellules B purifiées diminue la taille des lésions et l'infiltration de LT CD4⁺, démontrant le rôle protecteur des cellules spléniques. Cette protection est une propriété des cellules B des souris âgées atteintes mais pas des lymphocytes T [83]. Ce résultat a été confirmé par la transplantation de moelle osseuse déficiente en cellules B (souris μ MT) chez les souris *Ldlr*^{-/-} létallement irradiées (sans moelle osseuse). La souris receveuse ayant donc un déficit en cellules B et en anticorps souffre de lésions plus graves [196]. Ces résultats attribuent un rôle protecteur aux LB qui peut être due à leur activité humorale ou cellulaire.

Cependant, des études récentes ont dévoilé un effet athérogène des cellules B. La déplétion des cellules B, par administration systémique de l'anti-CD20, réduit la taille de lésions chez les souris (*ApoE*^{-/-} ou *Ldlr*^{-/-}) normo- ou hyper-cholestérolémiques. L'anticorps anti-CD20 permet de cibler préférentiellement les cellules B2 conventionnelles dans le sang, la rate et la moelle osseuse résultant en une réduction de plus 95% des LB. Cette déplétion n'affecte pas vraiment les cellules B1 de la cavité péritonéale des souris *ApoE*^{-/-}. Ce traitement est marqué par une diminution de taux sérique d'IgG anti-LDLox mais pas d'IgM [197]. Il n'est pas encore connu si cet anticorps permet la déplétion des cellules B tissulaires.

La déplétion des cellules B réduit l'activation des cellules dendritiques et des cellules T CD4⁺ locales. Au contraire de l'IFN- γ (diminue), la production de l'IL-17 était amplifiée. La neutralisation de l'IL-17 réduit l'effet bénéfique de l'anti-CD20 suggérant que l'IL-17 transmet l'effet protecteur de la déplétion des cellules B [197].

La déplétion des cellules B, synchronisée avec le régime riche en graisse (HFD), réduit l'infiltration des macrophages, le contenu lipidique de l'intima et le nombre des LB CD22⁺ dans les lésions (dès 8 semaines). Par contre, ce traitement n'a pas d'effet sur les LT CD4⁺ intimaux ni sur les paramètres métaboliques (poids, LDL cholestérol, HDL cholestérol, triglycérides). Les effets bénéfiques de ce traitement sont atténués chez une souris déjà atteinte d'athérosclérose avec une plaque déjà établie. La déplétion post-HFD réduit de 50 % les cellules B circulantes mais n'affecte pas les LB CD22⁺ ni LT CD4⁺ des lésions. Ces données montrent une résistance des cellules intimaux activées B CD22 à la déplétion anti-CD20 chez les souris *ApoE*^{-/-} à des stades avancés [198].

La prévention de l'athérosclérose (déplétion synchronisée avec HFD) par anti-CD20 diminue le taux d'IgG total et anti LDLox, mais pas d'IgM (8 et 12 semaines).

Quoique l'intervention anti-CD20 (déplétion post-HFD), durant l'athérosclérose, n'ait aucun effet sur les taux plasmatiques des différentes immunoglobulines (Ig, IgG, IgM) ni sur ceux des complexes immuns anti-LDLox, elle améliore la maladie. En résumé, ces effets, indépendants de la production de l'anticorps, suggèrent un rôle des cellules B dans la modulation de l'activité des LT. (Cet effet anticorps-indépendant est lié à l'absence de CD20 sur les plasmocytes sécréteurs d'anticorps) (figure 9).

Kyaw et al., ont continué à discriminer et caractériser le rôle des sous population des LB. Le transfert de cellules B2, mais pas de lymphocytes B1, à des souris TKO (lymphocytes déficientes) aggrave l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} hypercholestérolémiques et augmente la sécrétion de TNF- α mais pas d'IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12. Ces cellules transférées

vont majoritairement se domicilier dans les lésions athérosclérotiques. Donc les cellules B2 activées sont capables d'induire l'athérosclérose en absence de tout autre lymphocyte chez les souris *Apoe*^{-/-} [198].

Après, ils se sont intéressés à étudier l'effet protecteur de la splénectomie. Ils ont trouvé que la splénectomie réduit les cellules B1a péritonéales, l'IgM plasmatique et son dépôt lésionnel. Cette chute des IgM et des cellules B1a entraînent l'augmentation de la taille des lésions, du taux des LDLox et des débris apoptotiques dans les plaques. Par contre, les paramètres métaboliques et le contenu en collagène n'étaient pas affectés. Le transfert des cellules B1a reversait les effets de la splénectomie et inhibe le développement de l'athérosclérose. Cet effet protecteur est médié exclusivement par l'IgM vue que le transfert des cellules B1a *sIgM*^{-/-} (déficit en IgM) n'a aucun effet. Le taux plasmatique d'IgG est invariable dans ces études.

En conclusion, il semble que ce paradoxe sur le rôle de cellules B est dû aux différentes populations ciblées par les études. La splénectomie déplete les cellules B1a protectrices tandis que l'anti-CD20 cible les lymphocytes B2 pathogéniques (FO).

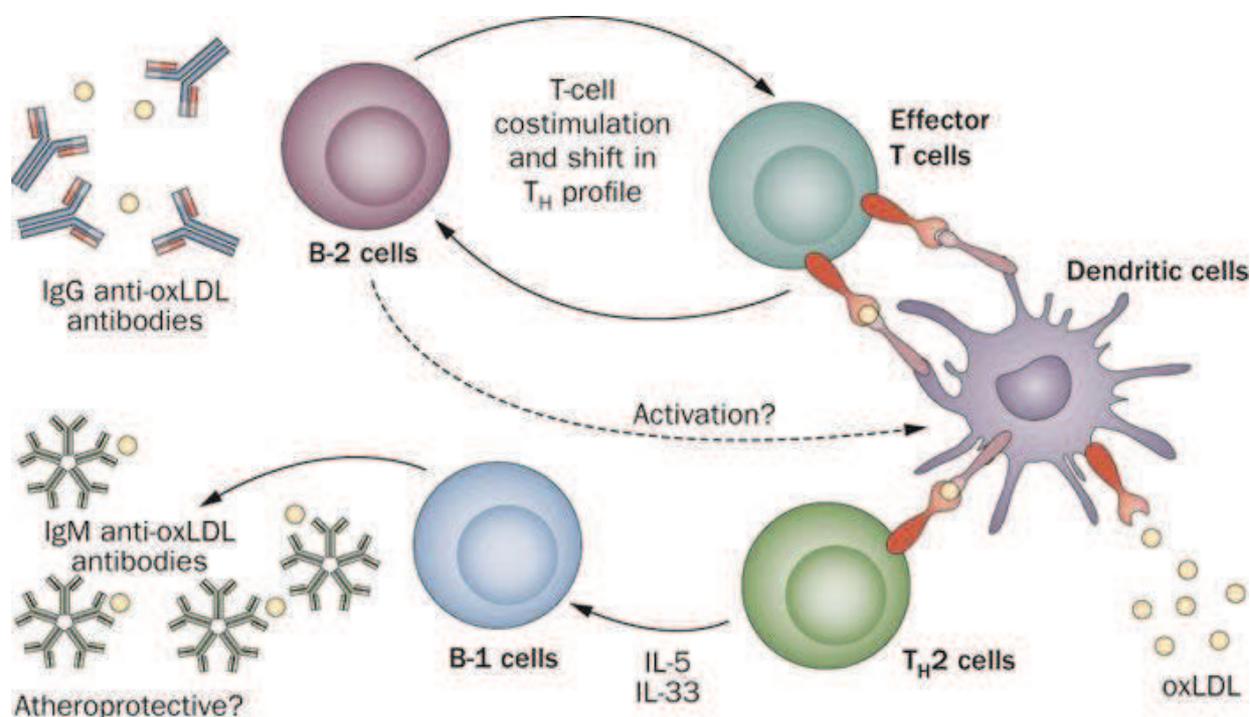


Figure 9 : Rôles possibles des lymphocytes B dans l'athérosclérose [199].

Toutes les études fonctionnelles des cellules B dans l'athérosclérose ont ciblé les LB circulantes d'une façon systémique mais pas vraiment les cellules B locales et l'immunité locale qui peut être totalement différent de l'immunité systémique. Doran et al., ont été les premiers à faire une approche qui cible les LB locaux. Ils ont empêché la domiciliation des cellules B dans la paroi artérielle en mutant *Id3* (inhibitor of differentiation 3) chez les souris *Apoe*^{-/-}. Cette étude a révélé un rôle protecteur des cellules B locales. Le transfert de cellules B *Id3*^{+/+} à des souris *Apoe*^{-/-} déficientes en cellules B (μ MT) inhibe le déclenchement ainsi que la progression d'athérosclérose tandis que l'injection de cellules B *Id3*^{-/-} n'a aucun effet. Bien que l'administration de cellules B *Id3*^{-/-} se manifeste par leur reconstitution normale dans tous les compartiments, elles sont faiblement détectées dans l'artère [168]. Les cellules B *Id3*^{+/+} artérielles se localisent dans les régions lipidiques de l'adventice les plus susceptibles à développer l'athérosclérose [159, 168].

La domiciliation adventitielle des LB murines dépend du facteur Id3 et de la chimiokine CCR6. Elle est associée à une diminution des macrophages artériels laissant ainsi supposer que les cellules B régulent l'accumulation macrophagique en sécrétant des cytokines. L'athéroprotection est indépendante des taux sériques d'Immunoglobulines. Quoique le taux sérique d'IgM anti-LDLox soit élevé, les souris Apoe^{-/-} Id3^{-/-} développent plus des lésions. La concentration sérique d'IgG n'est pas affectée par la mutation et elle est pareille chez les différents groupes.

En résumé, ces données montrent que l'athéroprotection est souvent portée par les cellules B résidentes dans l'artère. L'effet des cellules B dépend du contexte et plutôt des sous populations des LB [176]. Le polymorphisme de l'Id3 est associé à l'augmentation de l'épaisseur et la densité de l'intima [200].

A noter que c'était déjà montré que les cellules B captent les antigènes lipidiques de LDL [201] et les présentent par CD1d aux cellules NKT (lymphocyte Natural Killer T) [201]. Ces données suggèrent que les cellules B sont également capables de présenter les parties protéiques de LDL aux cellules CD4+ [202].

1.4 Antigènes

L'athérosclérose est un processus complexe multifactoriel qui se développe pendant des années. Pourtant, le fait que ces facteurs soient des vrais risques d'athérosclérose ou seulement des acteurs qui peuvent amplifier ce processus en des symptômes et signes cliniques n'est pas encore établi [203].

Ce doute est bien soutenu par la présence de 50 % des patients atteints d'une maladie cardiovasculaire avec une lipidémie normale [204]. En plus, la fréquence des facteurs de risque traditionnels (tabac, hypertension, hyperglycémie) chez des patients atteints d'une maladie vasculaire (cardiaque ou périphérique) est similaire à celle des individus âgés sains [205]. Ces résultats indiquent que les événements cardiovasculaires peuvent survenir également indépendamment des facteurs de risque traditionnels. Cependant, la présence au moins d'un facteur de risque, aggrave et amplifie les lésions artérielles. Les processus les plus confirmés et documentés d'athérosclérose sont le remodelage vasculaire et l'inflammation locale [203].

Les études expérimentales et cliniques ont révélés quelques antigènes possibles de l'athérosclérose tels que LDLox, HSP, bactéries ...

1.4.1 Lipoprotéines de basse densité oxydées (LDLox)

Au début, la contribution de l'immunité humorale à l'athérosclérose a été signalée par la détection des complexes immuns anti-LDLox dans le sérum et les lésions humaines et murines [195, 206]. Les isoformes modifiées de LDL sont immunogéniques et activent la réponse cellulaire et humorale [207].

Bien que les LT ne réagissent qu'avec les LDLox et pas native [195], une étude récente a démontrée que le LDL non modifié peut aussi induire l'athérosclérose en stimulant la réponse cellulaire des cellules T [208]. Les épitopes oxydés sont les premières cibles de la réponse immunitaire. Ces motifs modifiés constituent des DAMP (Danger Associated Molecular Pattern) exprimés sur les parois des cellules apoptotiques ainsi que des PAMP (Pathogen

associated molecular pattern) présents sur les microbes et les pathogènes. Ils sont capables de stimuler les 2 branches de l'immunité : innée (TLR, SR, PRR) et adaptative (figure 10) [209].

L'antigénicité du LDLox a été validée au niveau cellulaire. 25 % des lymphocytes T isolés des lésions humaines sont auto-réactifs contre le LDLox [210]. Ces LT sont aussi présents en périphérie chez l'homme et dans les ganglions lymphatiques chez les souris *ApoE*^{-/-} [211, 212]. Au niveau humoral, le taux d'IC anti-LDLox a été corrélé au risque de développement d'une maladie cardiovasculaire, néphropathie et de l'athérosclérose [213, 214]. L'étude clinique a révélé une corrélation positive d'IgG anti-LDLox avec l'athérosclérose à l'inverse de l'IgM [215]. Les IC humains contenant des IgG anti-LDLox déclenchent la formation des cellules spumeuses et amplifient l'accumulation intracellulaire de cholestérol [216-218]. La signalisation du récepteur FcγRI (récepteur du fragment cristallisable) sur les macrophages induit également la sécrétion de cytokines et de radicaux oxygénés [219].

L'étude des lésions humaines révèle la présence de dépôts d'IgM et IgG anti LDLox. L'IgG est l'isotype dominant qui est impliqué dans la formation des IC humains surtout l'IgG1 et l'IgG3 [207, 220, 221]. La majorité des études humaines sont des études cliniques mais pas fonctionnelles. Ces études suggèrent un effet pro-athérogène de l'IgG et protecteur de l'IgM mais aucune étude n'attribue un effet protecteur à l'IgG dans l'athérosclérose [207].

Ce sont les modèles murins qui ont permis d'étudier le rôle des AC anti-LDLox et de valider les résultats humains. Nicoletti et al., ont démontré que l'induction de la tolérance au LDLox atténue la réponse immunitaire et la progression d'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-}. Cet effet de tolérance suggère un effet pro-athérogène de la réponse immunitaire (IgG) anti-LDLox. La maladie modifie le TCR qui se normalise lors de l'induction de la tolérance [212]. En plus, Palinski et al., ont trouvé une corrélation positive entre anticorps anti-LDLox et l'évolution de la maladie chez les souris *Ldlr*^{-/-} [222]. Alternativement, l'immunisation des souris *ApoE*^{-/-} et des lapins avec des LDLox augmente le taux d'IgG anti-LDLox d'une façon T-dépendante. Pourtant, elle diminue la taille des lésions et du taux de cholestérol [84, 223]. Il est intéressant d'avoir les mêmes effets par l'immunisation et la tolérisation. Ce paradoxe peut être attribué à différents mécanismes activés par ces traitements [206]. Il faut noter que les anticorps résultants de l'immunisation ont des caractéristiques différentes que ceux libérés spontanément (naturellement) [224].

L'IgM naturelle inhibe l'internalisation du LDLox par les macrophages [73] tandis que l'IgG favorise la formation des cellules spumeuses chez les souris *Ldlr*^{-/-} [222, 225].

Ces conclusions ont été témoignées par l'interruption de l'interaction OX40/OX40L chez les souris *Ldlr*^{-/-}. La neutralisation du ligand OX40L entraîne l'augmentation d'IgM et la réduction d'IgG. Ces variations sont accompagnées d'une diminution de 53% de la taille des lésions [226]. En plus, les souris *ApoE*^{-/-} *FcγRI*^{-/-} sont protégées contre l'athérosclérose, prouvant ainsi la contribution importante des complexes immuns à la progression de la maladie [227]. Les IgM peuvent activer le système du complément. Les voies classique et dépendante des lectines sont protectrices et inhibent la progression de l'athérosclérose en éliminant les cellules apoptotiques des plaques. Par contre, l'activation de la voie alterne est associée à un effet pro-athérogène [228].

Les effets de ces anticorps IgG sont plutôt dus à leurs fonctions effectrices portées par leurs parties constantes. La formation de complexes immuns peut activer les FcγRI exprimées souvent sur les macrophages. Cette interaction aggrave l'athérosclérose humaine [229] tandis

que l'activation du FC γ RIIb inhibe et réduit la taille des lésions chez les souris *Apoe*^{-/-} [230]. En conclusion, le Fc γ RI est athérogène tandis que FC γ RIIb est protecteur. Chez les souris *Apoe*^{-/-}, l'inactivation générale des récepteurs de Fc inhibe la maladie. Cet effet est attribué à l'absence des FC γ R athérogène (Fc γ RI, Fc γ RIIIA) qui semble masquer l'effet athéroprotecteur de Fc γ RIIb [227]. Ces récepteurs engagent différentes voies de signalisation. L'activation des récepteurs athérogènes induit la formation des cellules spumeuses, l'activation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires [229] alors que le Fc γ RIIb inhibe l'activation des cellules B et leur production d'anticorps anti LDLox et de cytokines inflammatoires [230].

Une seule étude récente a noté la présence de taux élevé d'IgE sérique anti-LDLox chez les patients atteints d'infarctus du myocarde. Cet isotype était aussi présent dans les lésions humaines surtout à proximité des macrophages. Il stimule l'interaction entre TLR4 et Fc ϵ RI, induisant par suite la sécrétion des médiateurs inflammatoires et l'apoptose des macrophages chez les souris *Apoe*^{-/-}. L'IgE peut également affecter la signalisation des CML et EC humaines [231].

1.4.2 Heat Shock Proteins (HSP)

Les protéines de stress ou HSP sont induites par différents stimulus tels que la température, l'infection, les toxines et le stress mécanique [232]. Ces protéines, sécrétées par les tissus lésés, sont impliquées dans plusieurs fonctions de repliement, transport intracellulaire et protection des protéines [233].

HSP60/65 est bien conservée entre les différentes espèces surtout entre les bactéries et l'homme. Cet antigène majeur des microorganismes stimule la réponse humaine protectrice anti-bactérienne (humorale et cellulaire). Par contre, cette réponse peut être à l'origine des maladies auto-immunes à cause du risque de réactions croisées [233, 234]. L'HSP60/65 est un antigène potentiel dans plusieurs maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, diabète, lupus érythémateux systémique et sclérodermie) [233, 235, 236]. La réponse immunitaire anti-HSP bactérienne et son homologue exprimé sur les cellules endothéliales peut être le lien entre l'infection et l'athérosclérose [237].

Les monocytes exposés aux LDLox libèrent du HSP [238]. L'immunisation des lapins avec l'HSP-65 induit le développement de lésions d'athérosclérose et la production d'anticorps sérique anti HSP-65 indépendamment du régime alimentaire [169]. Les cellules T locales montrent aussi une réactivité importante contre l'HSP-65. Cette immunisation augmente la formation des cellules spumeuses chez les lapins et les souris hyper-cholestérolémiques [239]. Pourtant, l'administration muqueuse de l'HSP65 inhibe l'inflammation et l'athérosclérose chez les souris *Ldlr*^{-/-}. Cette immunisation est associée à une augmentation d'IL-10 ainsi qu'à une diminution du nombre de LT de la cavité nasale et du taux d'IgG totale anti-HSP [96]. Au contraire des lapins, l'immunisation des rats avec l'HSP-60/65 provoque la formation d'arthrite mais pas d'artériosclérose. Ces différences peuvent être due aux épitopes variés des HSP60/65 et à la variété des cellules cibles (cellules endothéliales, cellules synoviales...) [169]. Ces expériences montrent clairement l'impact du modèle choisi et de la voie d'administration des antigènes sur le type de la réponse immunitaire induite.

Le taux sérique humain d'anti HSP-60/65 est élevé au cours de l'hypertension [240] et de l'athérosclérose [241]. La présence d'Ac anti-HSP-60/65 est considérée comme un facteur de risque indépendant pour le développement de l'athérosclérose [169]

1.4.3 Glycosylphosphatidylinositol (GPI) et phospholipides

Les patients lupiques ont souvent des taux sériques élevés d'Ig anti-phospholipides et ont un risque accru de développer une athérosclérose. Ces anticorps (IgG) entraînent une hypercoagulation et des thromboses veineuses [242]. Leur mécanisme pathologique implique la formation du complexe pro-inflammatoire IgG- β 2GPI-LDLox [242]. La molécule β 2 GPI est exprimée sur les plaquettes et également sur certaines cellules endothéliales. Pareillement aux anti-HSP, les anticorps sériques anti-GPI sont détectés dans plusieurs maladies inflammatoires dont l'athérosclérose [240, 243].

L'immunisation des souris *Ldlr*^{-/-} avec le β 2 GPI induit des lésions athéroscléroseuses, suggérant un effet pro-athérogène du β 2-GPI [244]. Cet effet était confirmé par le transfert des cellules T spécifiques du β 2-GPI [245]. D'autres anticorps anti-phospholipides ont été dépistés par plusieurs études cliniques : Pratico et al., ont trouvé une corrélation entre les IgG et les IgM anti-cardiolipine oxydé (CLOx) et la progression de l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} [246].

La similarité moléculaire entre ces différents antigènes, que l'on retrouve aussi sur les membranes des cellules apoptotiques et chez certaines bactéries (*Streptococcus pneumoniae*), constitue le lien entre l'auto-immunité et la réponse pathogène dans l'athérosclérose. Ces antigènes communs sont reconnus par le même idiotype d'anticorps (T15) et les mêmes récepteurs d'immunité innée (figure 10) [247, 248]. L'immunisation de souris avec le pneumocoque induit la sécrétion d'anticorps, souvent IgM, qui ont une réaction croisée avec la phosphatidyl choline (PC) [249, 250].

La comparaison des anticorps naturels anti-LDLox et anti-phospholipides suggère que les anticorps anti- β 2-GPI et anti-PC sont deux entités indépendantes et présentant une faible réaction croisée avec les LDLox [220, 251-253].

1.4.4 Bactéries

Une étude épidémiologique suggère l'association entre l'infection à *Chlamydia pneumoniae* et l'infarctus. [254]. Cette infection est plus fréquente dans l'adventice de l'artère humaine. Sa présence dans l'intima est toujours associée à sa détection adventitielle mais pas l'inverse [151]. Elle aggrave l'athérosclérose et augmente la taille des lésions [255, 256].

L'immunisation par des pneumocoques des souris *Ldlr*^{-/-} augmente parallèlement le taux des IgM naturelles anti-LDLox qui interagissent aussi avec des épitopes pneumococciques. Cette vaccination protège les souris et réduit l'athérosclérose [249]. L'HSP de *Chlamydia pneumoniae* est l'antigène bactérien le plus ciblé par les LT des lésions humaines [257] mais d'autres antigènes sont également impliqués tel que la phospholipase D qui stimule le récepteur TLR4 et favorise la déviation vers un profil Th17 [258]. Bien que la présence de *Streptococcus pneumoniae* ait été confirmée, son rôle pathogénique exact reste controversé [259, 260]. Des études ultérieures de la contribution des réponses immunitaires anti-bactériennes à l'athérosclérose seraient souhaitables.

L'infection parodontale a été aussi associée à l'athérosclérose. Koren et al., ont noté la présence d'ADN bactérien dans les plaques humaines [261]. L'analyse de la composition bactérienne a révélé la présence de 13 phyla dans les plaques de 15 patients. Le *Chryseomonas* a été détecté chez tous les patients tandis que la *Veillonella* et le streptocoque ont été identifiés chez la majorité. De plus, de nombreuses espèces bactériennes sont communes à la cavité buccale, la flore intestinale et la plaque. Un taux de cholestérol plasmatique élevé est bien corrélé avec quelques infections bactériennes surtout celle lié au streptocoque. Cette étude suggère que la cavité buccale et la flore intestinale sont des sources potentielles de bactéries de la plaque. De plus, la charge bactérienne de la plaque est associée à un recrutement leucocytaire dans l'intima. Ces résultats suggèrent que les bactéries stimulent la réponse immunitaire innée [261]. Cette hypothèse est aussi soutenue par la résistance à l'athérosclérose acquise par les souris déficientes en TLR (TLR2, TLR4) [262, 263].

Par contre, d'autres études indiquent que les agents infectieux ne sont pas nécessaires au développement de l'athérosclérose. Wright et al., ont démontré que la progression de l'athérosclérose est indépendante du TLR4 et de la réponse aux bactéries Gram-négative. De plus, les souris axéniques développent de l'athérosclérose similairement aux souris sauvages [264].

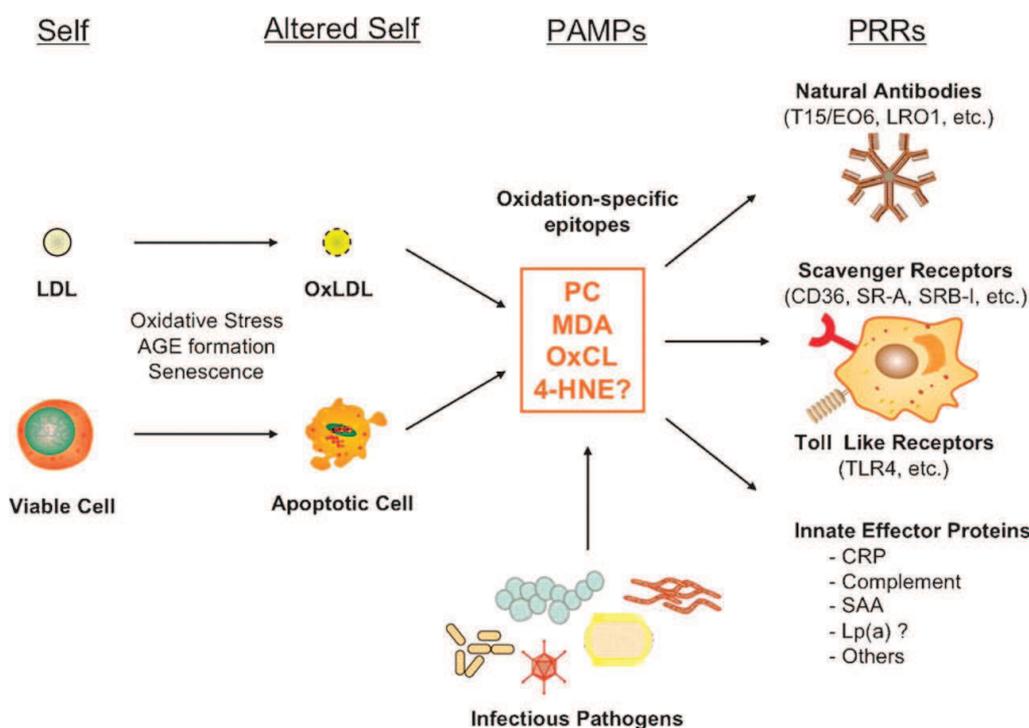


Figure 10 : les épitopes oxydés sont responsables de la réaction croisée. Elles constituent des PAMP reconnues par différents acteurs de l'immunité innée [265].

1.4.5 Autres antigènes divers

Des études cliniques ont détecté la présence d'auto-anticorps dirigés contre les cellules endothéliales dans plusieurs maladies et surtout dans l'athérosclérose. Ces auto-anticorps participent au dysfonctionnement et à la rupture endothéliale. Ils, surtout ceux qui ciblent le récepteur à la protéine C (ECPR) de l'endothélium, sont un véritable facteur de risque des événements cardiovasculaires humains [266, 267].

Des autoanticorps ciblant l'acide sialique N-glycolyneuraminic (Neu5GC) exprimé sur l'endothélium sont aussi sécrétés lors de l'inflammation. Ces anticorps stimulent l'activation endothéliale et la sécrétion des cytokines inflammatoires. Ils favorisent également les dépôts de complément et la fixation des monocytes. L'épitope Neu5GC, non codé génétiquement, est exprimé sur l'endothélium attaché aux plaques humaines et dans les régions sub-endothéliales. Ces données montrent l'effet pathogène d'un régime alimentaire riche en Neu5GC [268].

1.5 Cytokines

Les cytokines Th1 sont souvent associées à des effets athérogènes inflammatoires tandis que les cytokines anti-inflammatoires, sauf l'IL-4, ont vraisemblablement un rôle anti athérogène [269]. Par contre le rôle de quelques cytokines reste mal élucidé et défini. Parmi ces cytokines, se trouvent le GM-CSF, le TNF- α , l'IL-6 et la LT- α .

1.5.1 Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)

C'est un facteur qui régule la survie, la différenciation et la maturation de cellules myéloïdes [270]. Il induit la différenciation des monocytes en cellules dendritiques pendant l'inflammation [271]. Les LDLox induisent l'expression cellulaire du GM-CSF surtout dans les cellules endothéliales (humaines et murines) [270]. Cette expression affecte la prolifération et la migration des macrophages [270, 272]. Le rôle exact de ce médiateur dans l'athérosclérose reste inconnu. Les quelques résultats disponibles sont contradictoires. Ils varient en fonction du modèle expérimentale et régime utilisés. La déficience en GM-CSF réduit la taille de lésions, le nombre de cellules dendritiques et de lymphocytes T locales chez les souris *Ldlr*^{-/-}. Il semble que le GM-CSF a un effet régulateur sur les cellules dendritiques [273]. Il peut induire la prolifération ainsi que la maturation des cellules dendritiques CD11c⁺ dans les lésions précoces (d'origine monocyttaire) [274]. Par contre, cette déficience aggrave la maladie chez les souris *Apoe*^{-/-} [275].

L'analyse par RT-PCR montre l'expression du GM-CSF dans les lésions (humaines et murines). Ce facteur est exprimé par les macrophages, les cellules endothéliales et les CML. GM-CSF régule le phénotype des macrophages [276] et leur polarisation vers le phénotype inflammatoire M1 pro-athérogène [276, 277]. Il joue aussi un rôle critique dans la génération et le maintien des cellules TH17 en augmentant la sécrétion d'IL-6 par les CD [278]. D'autre part, le GM-CSF module le métabolisme lipidique. Il réduit le taux plasmatique de cholestérol en favorisant la clairance des LDL [279].

1.5.2 Interleukine-6

Il semble que l'IL-6 soit un marqueur des maladies cardiovasculaires [280]. Les plaques instables sont associées à un taux sérique d'IL-6 plus élevé que celui des cas d'angine stable [281]. En plus, le taux élevé d'IL-6 est prédictif d'infarctus du myocarde même chez l'individu normal [282].

Les résultats expérimentaux ont attribué des fonctions opposées à l'IL-6 [283]. L'administration d'IL-6 augmente la taille des lésions ainsi que les taux sériques de cytokines inflammatoires, chez les souris *Apoe*^{-/-} et C57BL/6 nourris avec HFD [284]. La contribution athérogène de cette cytokine peut résider dans sa capacité à stimuler l'expression du SR-A [285]. Néanmoins, l'inactivation d'IL-6 engendre la formation des lésions plus graves, après

15 semaines de régime hyperlipidique. Elle est marquée par une augmentation du taux de cholestérol sérique [286]. Toutefois, la déficience en IL-6 n'a pas d'effet sur les souris *Ldlr*^{-/-} [132]. Récemment, une étude a aussi révélé un rôle protecteur pour l'IL-6 chez les souris *ApoE*^{-/-}. Cette protection a été maintenue pendant 1 an sous un régime normal [287, 288]. L'IL-6 stimule la phagocytose des débris apoptotiques ainsi que l'efflux du cholestérol des macrophages. L'injection d'IL-6 est accompagnée d'une augmentation de sécrétion de l'IL-4 et de l'IL-10 [289].

En résumé, l'IL-6 peut exercer des effets contradictoires sur l'évolution de l'athérosclérose. Toutefois, cette cytokine est indispensable à la différenciation des cellules TH17 quelle que soit la voie empruntée (TGF- β ou IL-23) [290]. Il n'a pas encore été déterminé si les lymphocytes B dans l'athérosclérose sont la source majeure de la production de l'IL-6 comme c'est le cas au cours de certaines maladies auto-immunes [291].

1.5.3 Lymphotoxine- α (LT- α)

La LT- α est sécrétée principalement par les LT et les LB [292]. Cette cytokine organise et entretient la formation des CG ainsi que la maturation des LB dans ces néo-structures [293, 294]. Elle induit la formation des agrégats de cellules dendritiques folliculaires (CDF) autour des cellules B, indépendamment des cellules T et NK (Natural Killer) [294] et active également les cellules CD8⁺ [295]. Son rôle dans la formation des organes lymphoïdes a été examiné dans les plaques de Peyer. Bien que plusieurs cellules puissent sécréter de la LT- α [292], sa production par les LB est indispensable pour le maintien des follicules lymphoïdes [294, 296].

La recherche histologique révèle sa présence dans les lésions vasculaires murines. L'analyse fonctionnelle a montré que la perte de la LT- α diminue de 3 fois la taille des lésions intimes, établissant son effet direct sur l'évolution de la pathologie. La déficience en LT- α est associée à une réduction du taux plasmatique de cholestérol total et une augmentation de la fraction HDL [297].

1.5.4 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

Quoique la présence du TNF- α dans les lésions humaines soit confirmée [298-300], son rôle reste encore ambigu. Les études animales révèlent des effets contradictoires [301, 302].

Le TNF- α peut être sécrété par les macrophages, les cellules endothéliales, les CML [299] et les lymphocytes B [303]. L'internalisation des LDL modifiés amplifie la sécrétion du TNF- α par les monocytes [299]. De point de vue fonctionnel, cette cytokine induit l'expression de molécules d'adhésion leucocytaires [304-306], de chimiokines [307] et la sécrétion cytokinique [308]. Elle stimule également la prolifération cellulaire [309, 310], l'angiogenèse [311] et la nécrose cellulaire [299]. L'inactivation du TNF- α réduit la taille de lésions et inhibe le développement de l'athérosclérose chez les souris *ApoE*^{-/-} sans modifier le taux de cholestérol [312]. Ces effets démontrent un rôle pro-athérogène au TNF- α .

Par contre, Schreyer et al., ont montré des effets protecteurs du TNF- α . La signalisation du récepteur P55 (TNFR1) inhibe le développement d'athérosclérose. Les souris P55^{-/-} sont caractérisées par une augmentation d'expression et d'activité du récepteur scavenger SRA. Ces résultats suggèrent que le TNF- α inhibe l'expression du récepteur scavenger par les

macrophages [302]. Ces différences peuvent être dues à la présence d'autres récepteurs pour le TNF- α (TNFR2) et au régime alimentaire dans chaque étude [312].

Chez l'homme, différentes associations ont été faites. Skoog et al., ont signalé qu'un taux élevé de TNF- α est un facteur pronostic du risque cardiovasculaire [313] tandis qu'Elkind et al., ont trouvé que l'athérosclérose est plutôt corrélée au taux d'expression du TNF-R mais pas à celui du TNF- α [314].

CHAPITRE 2 :

LYMPHOCYTE B

2 Chapitre 2 : LYMPHOCYTE B

2.1 Généralités

L'immunité humorale permet de lutter et de neutraliser un grand nombre d'antigènes et d'agents infectieux par les Ig qui peuvent exister sous forme membranaires (mIg) ou comme anticorps sécrétés. La grande diversité des BCR (récepteur pour l'antigène des lymphocytes B) résulte des réarrangements de différents segments d'ADN au cours de différenciation des cellules B.

Les cellules B matures se développent, dans la moelle osseuse, à partir d'une cellule souche hématopoïétique indépendamment de l'Ag. Puis, elles circulent dans le sang et atteignent les organes lymphoïdes secondaires où ils rencontrent l'antigène. Ensuite, ces LB entrent en contact avec les LT pour continuer leur maturation et différenciation en cellules B mémoires ou plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

La synthèse des Ig est caractéristique des lymphocytes B. Cependant, les cellules B ont de nombreuses autres fonctions. Elles peuvent moduler l'activité des cellules T, contrôler la formation de structures lymphoïdes tertiaires et sécréter des cytokines. La cellule B peut donc contrôler la réponse inflammatoire et moduler l'activité des autres cellules immunitaires.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'immunité locale tissulaire et à la structure lymphoïde tertiaire formée dans l'adventice humaine adjacente à la plaque d'athérosclérose. Notre but consiste à caractériser le phénotype et les fonctions des cellules B résidentes. Pour cela, nous avons analysé le répertoire, les marqueurs de surface et la sécrétion cytokinique de ces lymphocytes. De plus, nous avons reconstruit certains des anticorps produits par les cellules B résidentes des parois vasculaires pour les utiliser comme réactifs afin d'identifier leurs antigènes cibles.

2.2 Description des locus des immunoglobulines humaines

Les Ig sont des hétérodimères protéiques extrêmement diversifiés et sécrétés exclusivement par les cellules B. Ils sont formés de l'association de 2 types de polypeptides appelés chaînes lourdes (H) et chaînes légères (L). Ces chaînes sont liées de façon covalente par des ponts disulfures. Le domaine N terminal de chaque chaîne (H ou L) constitue la région variable (V) tandis que la partie C-terminale représente la région constante. L'association des régions variables VH d'une chaîne lourde et VL d'une chaîne légère détermine le site de reconnaissance de l'antigène. La structure tertiaire de ces domaines est maintenue par 4 régions de charpente très conservées FR (Frame work Region) et entrecoupées par 3 régions de complémentarité à l'antigène CDR (Complementary Determining Region) (figure 12) [274, 315].

2.2.1 Chaînes lourdes

Les gènes des chaînes H sont localisés sur le chromosome 14 chez l'homme. Ils comprennent 125 gènes VH, 25 gènes D (diversité) et 6 gènes J (Jonction). Ces gènes comprennent 70 segments fonctionnels (38 V+23 D +6 J). Ces segments peuvent être classés par homologie de séquence en 7 familles VH et 7 familles D. [316, 317]. Ces gènes des régions variables sont suivis par 11 gènes codants pour les différentes régions constantes (C) des classes et sous

classes d'Ig dont 9 sont fonctionnels. Les gènes productifs des régions constantes sont organisés dans l'ordre suivant : C_μ , C_δ , $C_\gamma3$, $C_\gamma1$, $C_\alpha1$, $C_\gamma2$, $C_\gamma4$, $C_\epsilon1$, $C_\alpha2$ (figure 11).

2.2.2 Chaînes légères

Les locus codant les chaînes légères sont localisés sur le chromosome 2 pour les chaînes κ et sur le chromosome 22 pour les chaînes λ . Le locus $Ig\kappa$ est constitué de 76 gènes V_κ dont 31 à 35 sont fonctionnels et 5 segments J_κ . L'association de ces 2 segments compose la partie variable. Il n'existe qu'un seul segment C_κ pour la partie constante (figure 11) [316].

Le locus $Ig\lambda$ comprend 70 à 74 gènes V_λ avec 30 segments fonctionnels et 4 gènes J fonctionnels parmi les 7 J_λ possibles. Le nombre de gènes $Ig\lambda C$ varie de 7 à 11 dont 4 sont fonctionnels. Chaque gène C_λ est précédé d'un gène J_λ qui lui est propre (figure 11).

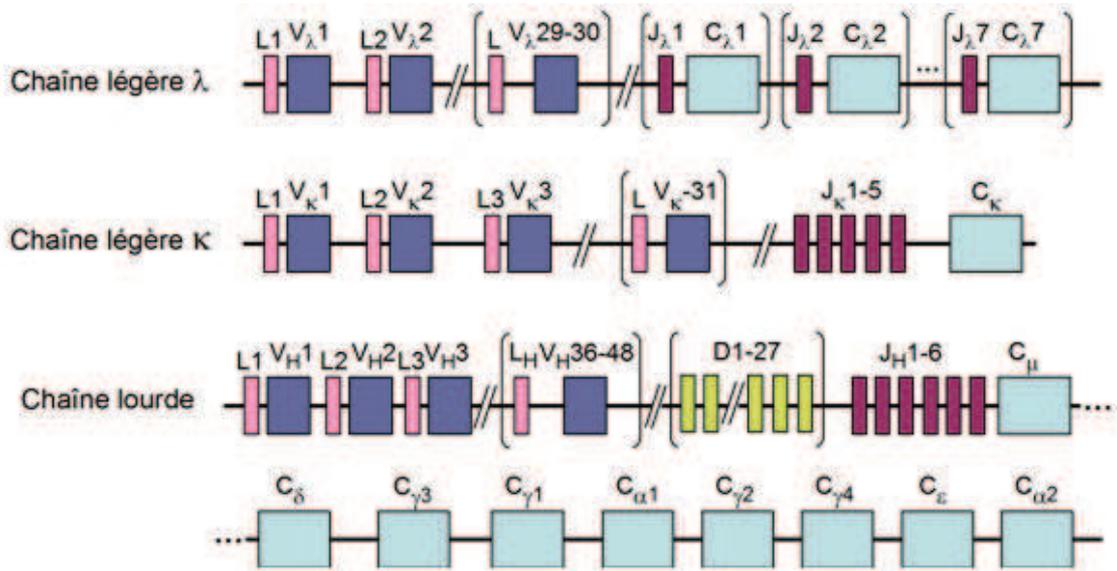


Figure 11 : Organisation du locus de chaînes lourdes et légères humaines [318].

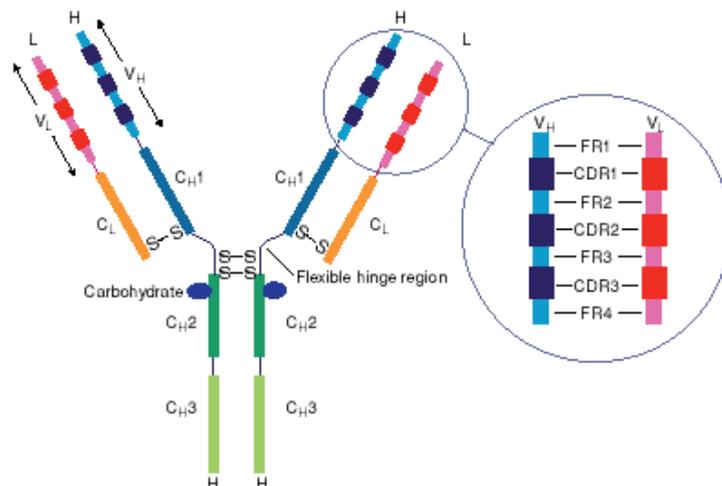


Figure 12 : Structure d'un anticorps

2.3 Réarrangements des immunoglobulines

L'information génétique est codée par de nombreux segments du locus IgH et IgL . La différenciation des lymphocytes B est associée et corrélée aux différentes étapes de synthèse

des Ig. Cette production implique l'association de segments V-D-J pour les chaînes lourdes et V-J pour les chaînes légères par un processus appelé réarrangement ou recombinaison V(D)J. Elle débute par l'association d'un segment D à un autre J avec excision de l'ADN intermédiaire. Puis un des nombreux gènes VH s'associe à l'ensemble DJ recombinaison pour engendrer un réarrangement VDJ. Des séquences signal de recombinaison (RSS) sont nécessaires à cette étape. Les RSS sont formées de deux motifs hautement conservés, un heptamère et un nonamère espacés de 12 ou 23 nucléotides (figure 13) [316]. Ces séquences, localisées aux extrémités 3'V et 5'J ainsi qu'aux 2 extrémités de D, permettent l'orientation de réarrangement VDJ [319] et le recrutement des enzymes de recombinaison (RAG-1 et RAG-2) [316, 320]. Les gènes V sont suivis par des motifs RSS séparés de 12 nucléotides pour le locus Igκ, 23 nucléotides pour les locus Igλ et IgH. Par contre, les motifs en amont de J sont séparés de 23 nucléotides pour Igκ et IgH et 12 nucléotides pour Igλ (figure 13). Cet espace entre les motifs correspond à des tours complets de l'hélice d'ADN. Les réarrangements d'un locus ne peuvent se produire que si les espaces des RSS de V et J sont hétérogènes (12 et 23) [321]. Le complexe enzymatique Recombinase est capable d'achever la coupure de l'ADN [322]. Cependant, la présence de cofacteurs protéiques (High mobility group protein : HMG-1, HMG-2) améliore l'efficacité de cette réaction [323]. D'autres enzymes sont impliquées dans la réparation de l'ADN ayant des extrémités non homologues (NHEJ : Non-Homologous End joining) libérées après le clivage (Ku70/80, DNA-PKc...)

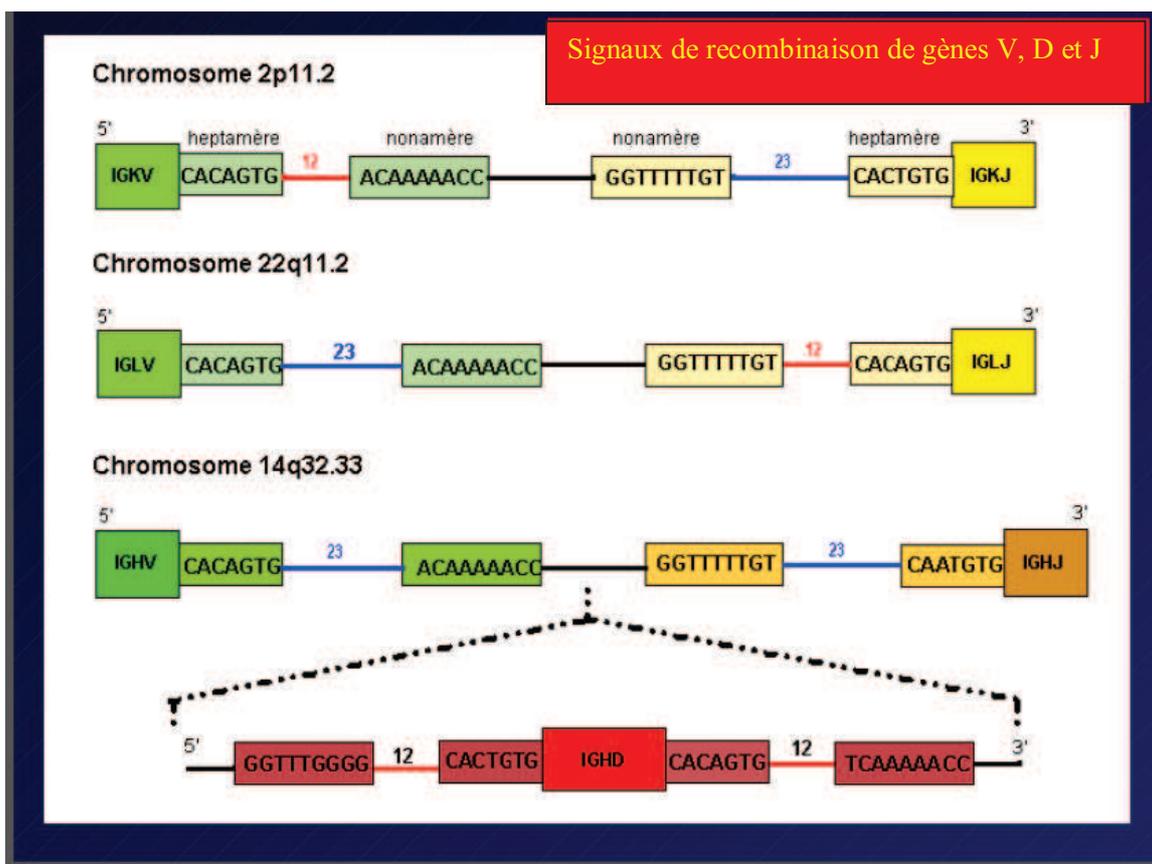


Figure 13 : Séquences signaux de recombinaison chez l'homme.

Mécanisme

Le complexe RAG1-RAG2 reconnaît les RSS des gènes pré-réarrangés et les réunit en un complexe synaptique (figure 14). L'activité hélicase permet au complexe RAG de couper l'ADN double brin conduisant ainsi à la libération des extrémités franches et à la formation d'une boucle intermédiaire en épingle à cheveux.

L'étape suivante implique une large machinerie enzymatique de réparation de l'ADN. Le complexe protéique Ku70/80, qui reconnaît les extrémités codantes des structures en épingle à cheveux, s'associe au DNA-PK pour recruter le facteur Artemis. Ce dernier est responsable du clivage de ces structures (figure 14) [324, 325].

L'ouverture des structures en épingle à cheveux est associée à l'addition ou à la délétion de nucléotides palindromiques P lors d'une coupure non symétrique. D'autres modifications (éliminations et additions) de nucléotides sont liées à l'activité de l'enzyme déoxynucléotidyl terminale transférase (TdT) [326]. L'isoforme courte de la TdT est responsable de l'ajout de nucléotides tandis que la plus longue a une activité exonucléase [327, 328]. La TdT ajoute souvent des nucléotides G et C d'une manière aléatoire en absence d'une matrice. Cette insertion de N nucléotides augmente la diversité des chaînes lourdes de BCR surtout au niveau des jonctions et donne une signature spécifique clonale aux lymphocytes B.

Ensuite, les séquences sont liées entre elles pour former des segments codants. Cette liaison nécessite l'activation des plusieurs facteurs et enzymes protéiques (complexe XRCC4-cernunnos, TdT et DNA-ligase IV...). L'ARN pré-messager comportant l'exon VDJ réarrangé et la partie constante est ensuite épissé pour donner un ARNm mature.

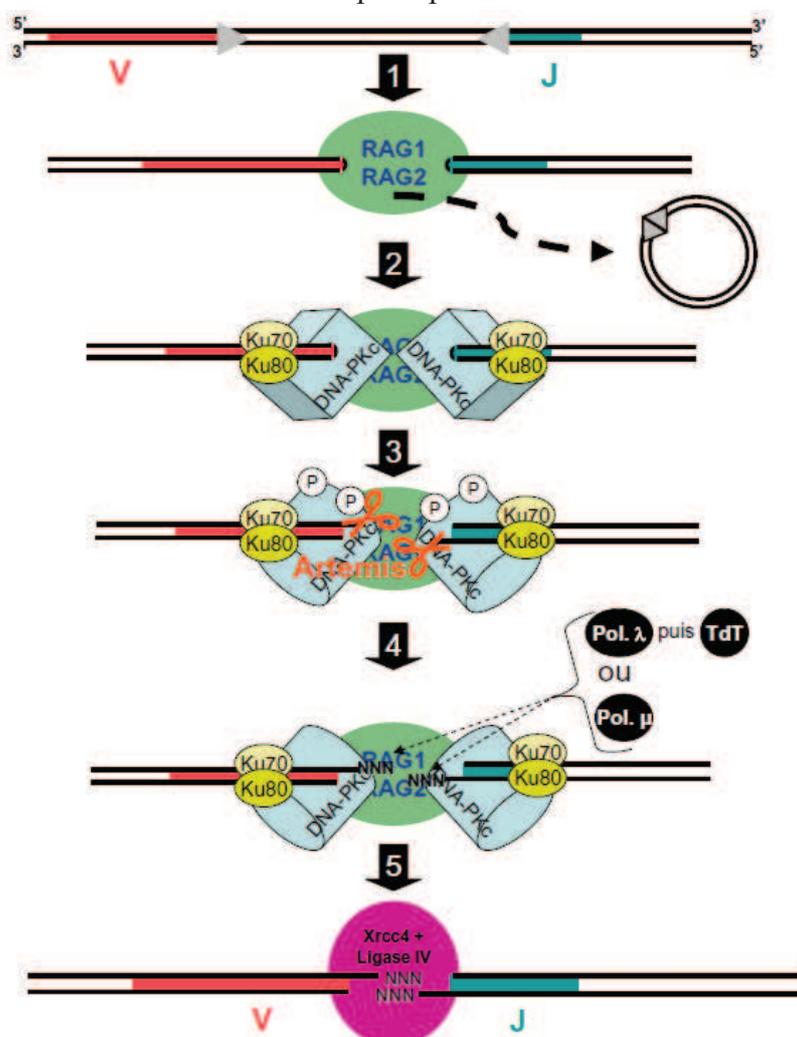


Figure 14 : Mécanisme de la recombinaison.

2.4 Lymphopoïèse et différenciation des cellules B

La maturation d'un LB à partir d'une cellule hématopoïétique se déroule dans la moelle osseuse. Cette phase indépendante de l'antigène produit des cellules B naïves exprimant des

IgM et IgD de surface. Elle dépend des étapes de réarrangement des immunoglobulines et de l'interaction avec les cellules stromales.

Des étapes ultérieures de différenciation secondaire se produisent dans les organes lymphoïdes secondaires lors de la rencontre de l'antigène spécifique (hypermutations somatiques, commutation de classe..) aboutissant à la formation de plasmocytes et de cellules mémoires.

2.4.1 Cellule souche progénitrice

Une cellule souche hématopoïétique est une cellule multipotente capable de se différencier en toute cellule sanguine [329]. Elle peut engendrer également un progéniteur myéloïde ou un progéniteur lymphoïde. Ce dernier est à l'origine des cellules dendritiques, NK, T, B humaines et murines mais pas des cellules myéloïdes [330, 331]. Le précurseur lymphoïde peut engendrer la formation de 2 progéniteurs différents : un pour les LT et un autre pour les LB. Le précurseur de LT migre vers le thymus tandis que celui de lymphocytes B réside dans la moelle osseuse [332].

La différenciation des cellules B peut être décrite selon le stade de réarrangement des gènes d'Ig et les marqueurs de surface.

2.4.2 Stade pré-pro B

C'est à ce stade que l'on peut observer les premiers signes de l'engagement cellulaire dans la lignée B tels que l'expression des marqueurs de surface CD220 et CD43. A cette étape la molécule CD19 n'est pas encore présente [333, 334]. Les cellules pré-pro B expriment faiblement RAG-1 et RAG-2 mais fortement des transcrits germinaux JH-C μ (μ 0) : Le locus des CH n'est pas réarrangé [335] mais est activement transcrit [336, 337] laissant supposer que l'accessibilité des gènes d'Ig précède l'activité de Recombinase.

2.4.3 Stade pro-B

C'est à ce stade que commencent les réarrangements des gènes des chaînes H [338]. Ils débutent entre les gènes DH et JH des 2 allèles pour s'associer ensuite à un segment VH pour former un exon complet VDJ (figure 15). Les cellules pro-B expriment le CD19 ainsi que les antigènes des cellules souches CD34 et CD117. En outre, les corécepteurs Ig α /Ig β (CD79a et b) apparaissent à la membrane des cellules en association avec la calnexine [339].

Parallèlement, l'IL-7 induit l'expression de la pseudo-chaîne légère constituée des molécules V-pré B et λ 5 [339, 340] alors que le complexe CD79 (a et b) contrôle l'expression de quelques marqueurs de surface et la transition vers la cellule pré-B [339] ainsi que le développement normal dans la lignée B [341].

2.4.4 Stade pré-B

Le stade pré-B est caractérisé par le second réarrangement V-DJ (figure 15) permis par l'action du facteur Pax5 et de l'IL-7 [342, 343]. Cette étape entraîne l'apparition d'un pré-BCR membranaire constitué de 2 chaînes lourdes μ réarrangées associées aux pseudo-chaînes légères et au complexe Ig α /Ig β [338]. Cette transition de pro-B en pré-B est contrôlée par le pré-BCR qui stimule la prolifération des cellules pré-B ayant un locus IgH réarrangé [344]. Ce récepteur peut être stimulé par la galectine-1 du stroma de la moelle osseuse [344]. D'autres observations suggèrent cependant que la signalisation de pré-BCR est indépendante du ligand [345].

Toute mutation d'un facteur de ce complexe bloque la différenciation des cellules B. L'inactivation soit du Vpré-B [346], $\lambda 5$ [347], $Ig\beta$ [341] ou des chaînes μ [348] empêche la formation de cellules B naïves. De plus, la signalisation du complexe $Ig\alpha/Ig\beta$ inhibe l'expression des RAG [349] et le réarrangement du locus Igh du deuxième chromosome. Donc, ce récepteur maintient un point de contrôle essentiel à l'exclusion allélique [350, 351]. Ce stade est également marqué par les premiers réarrangements des gènes des chaînes L et la réexpression du complexe des RAG [338]. La recombinaison des chaînes légères débute sur le locus $Ig\kappa$ d'un des 2 chromosomes. Le processus s'arrête à cette étape dans le cas d'un réarrangement fonctionnel. Si aucune recombinaison productive d'un des 2 allèles κ ne s'est produite, les réarrangements se poursuivent au locus $Ig\lambda$ [352]. Le stade pré-B est marqué par la perte des marqueurs de surface C-kit et CD43 et l'apparition du CD25 [353] et du CD20.

2.4.5 Stade B immature

A ce stade, la cellule B exprime le récepteur membranaire BCR (figure 15). Ce récepteur est formé de :

- 1- L'association de la chaîne lourde μ , la chaîne légère correspondante qui va remplacer le pseudo chaîne légère.
- 2- Complexe $Ig\alpha/\beta$ (CD79a et CD79b), des phosphoprotéines transmembranaires à motifs ITAM (immunorécepteur tyrosine-based activating motif) [332]. La formation du BCR est un deuxième point de contrôle de la maturation de lymphocyte B.

Les LB auto-réactives sont éliminées par apoptose tandis que les autres cellules migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Néanmoins, les cellules B humaines ou murines dont le BCR est dirigé contre le soi peuvent subir un réarrangement secondaire des chaînes légères modifiant ainsi leur spécificité antigénique [354-357]. Chaque lymphocyte B exprime 50000 molécules BCR membranaires identiques. Des petites variations dans la structure de l'immunoglobuline sont largement suffisantes pour changer la spécificité du BCR [358].

Environ 90% des cellules de la lignée B n'atteignent pas le stade de cellules B immatures [359, 360] qui elles représentent 2% des lymphocytes B circulants [361, 362].

Les cellules B co-expriment ensuite 2 isotypes d'Ig membranaires : l'IgM et l'IgD ainsi que les marqueurs de surface CD21 et CD23. Ces cellules sont dites naïves parce qu'elles n'ont pas encore subi une maturation liée à l'antigène. Elles ont une durée de vie courte et sont programmées pour mourir en quelques jours [358]. Seulement 3 à 5% des LB engagés dans la voie de différenciation rejoignent le stock périphérique de cellules matures [363].

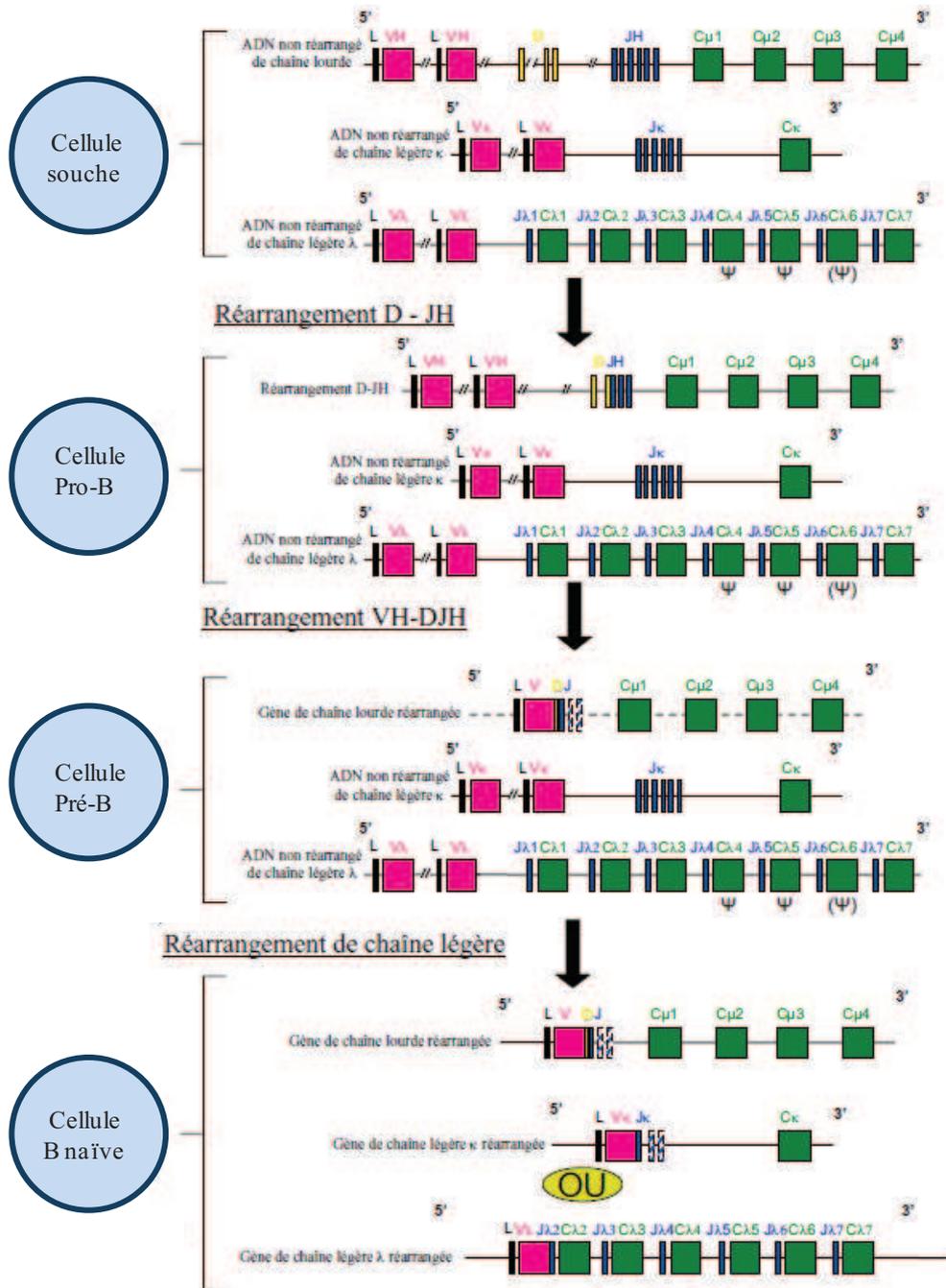


Figure 15 : Relation entre recombinaison VDJ et différenciation des cellules B (chronologie).

2.5 Maturation périphérique des LB

Les lymphocytes B naïfs IgM⁺ IgD⁺ ayant un BCR fonctionnel et non auto réactif quittent la moelle osseuse et migrent aux organes lymphoïdes secondaires.

Après rencontre de l'antigène, les cellules B se différencient soit en plasmocyte sécréteur d'anticorps soit en cellule mémoire. Cette différenciation peut suivre 2 voies différentes. Elle peut prendre le chemin extra-folliculaire aboutissant à la formation des plasmocytes de courte durée. Alternativement, elle peut s'engager dans un chemin plus complexe engendrant la formation d'une structure spécialisée appelée centre germinatif (CG) du follicule lymphoïde secondaire. Les lymphocytes ayant une affinité suffisamment forte pour un antigène vont s'engager dans la voie de différenciation des LB folliculaires (B FO) qui vont migrer pour rencontrer l'antigène présenté par les cellules folliculaires dendritiques [364-367]. Par contre, les cellules qui reconnaissent l'antigène avec une faible affinité se différencient en cellule B

de la zone marginale (B MZ) [365]. Toutefois, les cellules naïves peuvent se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps naturels [323].

Par ailleurs, les cellules B participent à l'immunité adaptative spécifique T-dépendante (B2) ainsi qu'à l'immunité innée T-indépendante (B1, MZ). Cette différence dépend de la nature des différents antigènes [368]. Ces cellules se distinguent par leur localisation anatomique, leur fonction et leur phénotype [369]).

2.5.1 Réponse primaire - Réponse T-indépendante (TI)

2.5.1.1 Antigènes

Cette réponse TI représente la première ligne de défense anti-pathogène. Elle est rapide et secrète souvent des IgM naturelles [316].

Quelques antigènes ont la capacité d'inciter une minorité de LB à se différencier en plasmocytes à courte durée de vie indépendamment des lymphocytes T [358, 370]. Ces plasmocytes sécrètent des Ac de faible affinité, poly-réactifs en absence de toute stimulation antigénique exogène [371-373]. Ces anticorps, appelés anticorps naturels, sont souvent IgM mais peuvent être IgG ou IgA [374].

Les antigènes impliqués dans cette réponse sont divisés en 2 classes (I et II) :

-Les antigènes du type I agissent sur les cellules B indépendamment du BCR. Ils peuvent stimuler les TLR et déclencher ainsi une cascade d'activation aboutissant à la sécrétion d'anticorps [375]. Les lipopolysaccharides bactériens sont un bon modèle de ce type d'antigènes [376]. Cependant, ces antigènes stimulent les cellules B matures autant qu'immatures sans aucune préférence [377].

-Les antigènes de type II sont incapables d'activer les LB [378] mais stimulent la polymérisation du BCR [376]. Cette association du BCR induit le recrutement d'un récepteur supplémentaire tel que le CD21 [379]. Cette réponse nécessite l'intervention des cellules dendritiques spécifiques qui sécrètent plusieurs facteurs tels que BLYS (stimulateur de lymphocyte B) et APRIL (A proliferation Inducing Ligand) [380]. La coopération cellulaire CD-B permet la différenciation des cellules B en plasmocytes [380]. Les antigènes impliqués sont souvent des macromolécules avec des structures répétitives telles que les polysaccharides bactériens (pneumonie, influenza) [378].

2.5.1.2 Cellules engagées

Les cellules B activées par les Ag (I et II) prolifèrent et continuent leur différenciation dans la zone marginale des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...). Les cellules B répondant aux antigènes T-indépendant sont classées en 2 sous populations B1 et B MZ [381]. Ces cellules sont aussi appelées cellules B innées [382].

L'expression du marqueur CD5 permet de distinguer 2 types de cellules B1 murines: B1-a ($B220^{low} CD19^{hi} IgM^{hi} IgD^{low} CD43^{+} Mac-1^{+} CD5^{+}$) et B1-b ($CD5^{-}$) [383]. Ces lymphocytes, caractérisés par leurs immunoglobulines non mutées, sont le plus fréquemment retrouvés dans la cavité péritonéale et pleurale, faiblement dans la rate mais jamais dans le sang ni dans les amygdales des souris [383]. Ces cellules participent à la production d'anticorps naturels en absence de toute stimulation antigénique [384]. Les cellules B1a sont plutôt impliquées dans la réponse contre les LPS tandis que les cellules B1b sont engagées dans la réponse contre des polysaccharides TI [385, 386]. Cette population est retrouvée chez l'homme avec une répartition tissulaire différente. On retrouve ces cellules B1 humaines dans le sang (10-20%), dans les amygdales (15-30%) et dans la rate (10%) [387]. Chez l'homme, les cellules B1a et

B1b (CD5⁺ et CD5⁻) participent également à la production d'anticorps naturels [371]. Elles constituent une proportion significative des plasmocytes IgA de l'intestin. Néanmoins, elles sont faiblement impliquées dans la réponse humorale T-dépendante [388]. Cette extrapolation des résultats chez l'homme doit se faire avec précaution [383]. Des études récentes remettent en question la validité du marqueur CD5 pour distinguer et différencier les cellules B productrices d'anticorps (B1 et B2). Des études phénotypiques supplémentaires des sous populations de cellules B devraient permettre de déterminer le profil de chacune [371].

La faible signalisation du BCR conduit à la formation de cellules MZ indépendamment des lymphocytes T [365]. Ces cellules MZ sont également capables de se délocaliser et s'engager dans une réponse TD par l'intermédiaire de molécules de surface (CD21) [389]. Elles peuvent se comporter comme des cellules CPA (Cellule Présentatrice d'Antigène) compétentes pour présenter les antigènes protéiques aux cellules T [390] ainsi que les antigènes lipidiques aux cellules NKT [391]. Ces lymphocytes se localisent, comme leur nom l'indique, dans la zone extra-folliculaire de la rate humaine [392]. Des études récentes suggèrent que les lymphocytes B MZ sont la source majeure des Ac naturels dans la réponse contre les antigènes TI [393]. Ils participent préférentiellement aux réponses rapides contre des antigènes apportés par le flux sanguin [369]. Les marqueurs caractérisant le phénotype des cellules B MZ sont : CD27⁺ IgM⁺ IgD^{low} CD23⁻ CD21⁺ Cd1c⁺ et souvent CD5⁻ [394] (10-15% des lymphocytes B circulants) [395]. Le CD1c est vraisemblablement un bon marqueur des cellules B MZ circulantes [381].

Les précurseurs de ces différentes populations cellulaires sont mal connus. Cette différenciation sélective reste toujours mystérieuse. Elles pourraient résulter d'une voie de différenciation distincte des cellules B classiques [368]. La spécificité du BCR guide la cellule B naïve à rejoindre et à se domicilier dans les régions B1 ou MZ plutôt que vers les compartiments folliculaires (B2). En conclusion, la signalisation du BCR oriente et maîtrise le destin des cellules B [388, 396-400].

2.5.2 Réponse T-dépendante (TD)

La production d'anticorps neutralisants nécessite une différenciation périphérique des LB en présence d'antigènes qui sont souvent de nature protéique [401]. Cette différenciation a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions, la rate et les amygdales ainsi que dans la majorité des organes et tissus périphériques de l'organisme. Ces organes sont le siège d'une réponse immunitaire locale [358].

Cette maturation périphérique engendre la formation de structures spécifiques appelées CG. Le lymphocyte B activé migre dans un follicule lymphoïde primaire et prolifère, engendrant la formation d'un CG et d'un follicule secondaire. Ces structures apparaissent dans un délai de quelques jours après la stimulation antigénique suite à l'accumulation des différentes cellules immunitaires [402]. Donc, ces lymphocytes B folliculaires (FO) sont impliqués dans les réponses T-dépendantes tardives et dans la production d'anticorps neutralisants contre des antigènes spécifiques [403].

Les organes lymphoïdes secondaires sont formés de 2 compartiments : zone corticale et para-corticale. La zone corticale ou zone marginale est riche en follicules lymphoïdes surtout en LB tandis que la zone para-corticale contient surtout des LT et des CD. Les LB activés rencontrent les LT pour la première fois au bord de la zone folliculaire (entre zone folliculaire

et zone T). Ensuite, les cellules B pourraient soit migrer dans la zone folliculaire et élaborer un CG, soit migrer dans la zone extra-folliculaire et se différencier directement en plasmocytes à courte durée.

L'expression du répresseur transcriptionnel BCL-6 (B Cell Lymphoma 6) engage les cellules B dans la voie folliculaire tandis que celle de Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein-1) permet leur différenciation en plasmocytes à courte durée de vie dans la zone extra-folliculaire [359, 404, 405]. La voie empruntée par les cellules B (extra ou CG) dépend de l'intensité de stimulation du CD40 et du BCR [366, 367].

Centres Germinatifs :

Le CG éloigne en périphérie (zone corticale) les lymphocytes B au repos et les cellules des follicules primaires qui constituent une couronne dont le phénotype est : $IgM^+ IgD^+$, $CD5^+$, $CD23^-$, $CD39^+$. Ces follicules primaires stimulés prolifèrent pour engendrer les folliculaires secondaires qui sont à l'origine du CG [358]. La maturation dans le CG est indispensable à la survie des lymphocytes B et à la sécrétion des anticorps neutralisants (figure 16).

Le CG est formé d'une zone sombre et une zone claire. Les lymphocytes B rentrent dans la zone foncée du CG se différencient en centroblastes proliférant massivement. Ils subissent des modifications locales telles que les mutations somatiques et acquièrent le phénotype : $CD10^+$, $CD23^-$ $CD95^+$ Ig^- . Ensuite, ces centroblastes cesseront de se diviser, migreront dans la zone claire et se différencieront en centrocytes ($CD23^-$ $CD95^+$ Ig^+) [406] qui subissent une sélection en fonction de leur affinité antigénique. Les cellules B de faible affinité antigénique ou auto-réactives sont éliminées, tandis que les autres cellules spécifiques rentrent contact une deuxième fois avec les lymphocytes Th pour finaliser leur différenciation en plasmocytes et cellules B mémoires.

Les LB sélectionnés (BCR de haute affinité) sont capables de reconnaître les antigènes présents à la surface des cellules folliculaires dendritiques pour les présenter, de suite, aux lymphocytes folliculaires $CD4^+$ (TFh) [364, 407, 408]. Ces derniers contrôlent la survie des LB en fonction de l'affinité de leur BCR muté. Les co-récepteurs interviennent également et peuvent affecter la signalisation du BCR soit en inhibant via CD22 et CD72 soit en stimulant via CD19/CD81/CD21 [409]. Ce complexe membranaire peut moduler l'interaction T-B.

Après la stimulation antigénique, les CG disparaissent en quelques jours ou semaines. Quant aux cellules B sécrétant des anticorps de haute affinité, elles persistent et survivent de quelques semaines à quelques années et représentent le répertoire mémoire [410, 411].

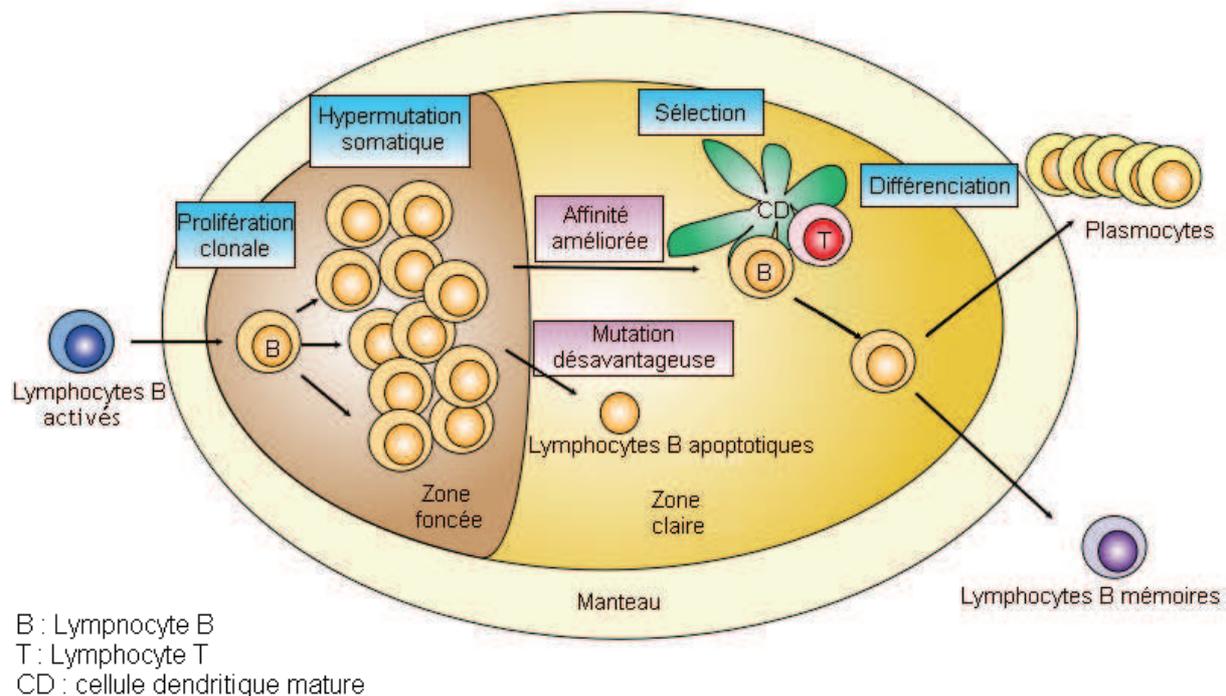


Figure 16 : Schéma représentatif du centre germinatif

2.6 Modifications

Le GC est le siège de nombreuses modifications [406] qui sont indispensables à la maturation des lymphocytes B et à l'efficacité de la réponse immunitaire telles que la commutation de classe et les hypermutations somatiques. Les cellules B subissent ces changements sous l'action conjuguée du CD40L et des cytokines sécrétées par les LT activées. Cette interaction T-B induit l'expression de l'enzyme AID (Activation induced cytidine deaminase).

2.6.1 Hypermutation somatique (HMS)

Ce phénomène est responsable de la diversité et de la maturation d'affinité des anticorps (VDJ) lors de la réponse TD [412, 413]. Il consiste souvent à l'apparition de mutations ponctuelles (transitions plus que transversions) dans les séquences VDJ mais d'autres mutations telles que les insertions et délétions sont aussi possibles [414]. Des nombreuses études ont montré la corrélation entre la transcription et l'hypermutation somatique [415]. La fréquence des mutations est inversement proportionnelle à l'éloignement du promoteur et le taux des HMS diminue après la délétion du promoteur [416]. Les mutations silencieuses sont couramment observées dans les FR tandis que les mutations des CDR entraînent souvent des changements d'acides aminés [417]. Ce processus nécessite une protéine nommée AID qui est induite *In vivo* d'une façon transitoire exclusivement dans les centres germinatifs [418].

L'enzyme AID provoque la déamination des cytosines (dC) en uraciles (dU) dans l'ADN créant un mésappariement qui recrute la machinerie de réparation de l'ADN [419, 420]. Les différentes possibilités de traitement et de réparation des mutations déterminent leur devenir (figure 17) :

- La mutation peut être ignorée et donc considérée comme une simple transition C en T.
- l'uracile peut être éliminé par l'uracile glycosylase (UNG) entraînant l'absence d'une base qui peut être remplacée par une des quatre bases possibles [420].
- le mésappariement peut être réparé par le système de réparation de mésappariement nucléotidique (MMR) qui excise l'uracile ainsi que les bases adjacentes [421, 422].

La présence d'AID est suffisante pour induire l'hypermutation somatique [423] aussi bien dans les LB que dans d'autres cellules comme les fibroblastes [424].

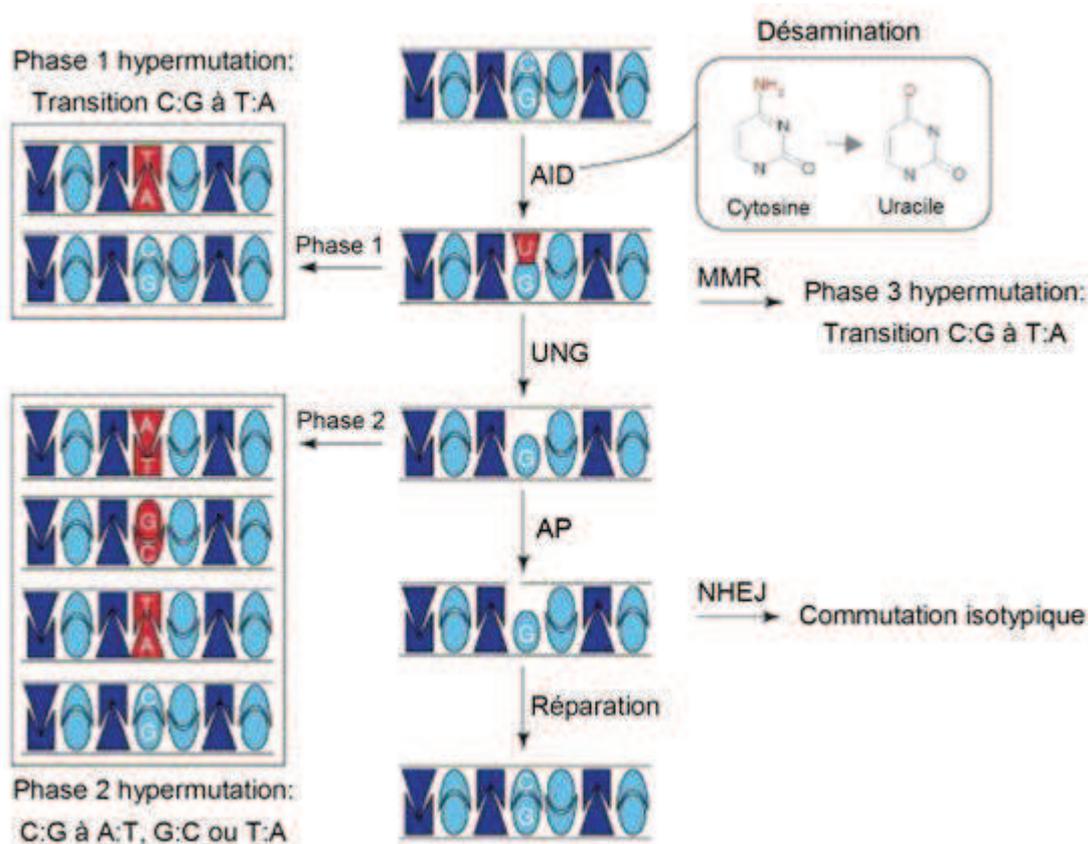


Figure 17 : Implication de l'AID dans l'hypermutation somatique. Les différentes possibilités de traitement des mutations (phases 1, 2, 3).

2.6.2 Commutation de classe

La spécificité antigénique est codée par les régions variables tandis que la fonction effectrice dépend de la partie constante des chaînes lourdes [425].

Pendant la maturation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes (GC), les parties V et C sont également affectées. Les cellules B activées secrètent d'abord des IgM dont la partie constante peut être remplacée par d'autres isotypes en gardant la même partie variable (VDJ). Ce processus s'appelle commutation isotypique ou commutation de classe (CSR : class switch recombinaison). Il implique une recombinaison somatique qui rapproche la région VDJ et un segment constant autre que C μ . Par la suite, les lymphocytes B peuvent sécréter différents isotypes d'anticorps : IgG, IgA, IgE.

Ce mécanisme est possible grâce à des séquences signal appelées « séquences switch S » situées en amont de chaque gène IGHC à l'exception de C δ . Elles sont composées de motifs (20 à 80 pb) répétés (gggt et gagct) [358]. La recombinaison somatique rapproche S μ d'une séquence S d'un autre isotype IGHC, entraînant ainsi l'excision de l'ADN intercurrent. En fait, une boucle va rapprocher VDJ du segment C correspondant favorisant ainsi la synthèse d'Ig avec une chaîne constante autre que C μ (figure 18) [426, 427].

L'enzyme AID est indispensable à ce processus. La déficience en AID ainsi qu'en CD40L entraîne le syndrome humain de déficit immunitaire avec hyper IgM (HIGM) dû au défaut de commutation de classe. Ces patients ont une forte susceptibilité aux infections bactériennes, attribuée à l'absence d'autres isotypes (IgG, IgA et IgE) [428].

La commutation de classe varie en fonction de l'organe lymphoïde secondaire. L'IgG est l'isotype dominant dans les ganglions lymphatiques et la rate tandis que l'IgA est majoritaire dans les plaques de Peyer, le tube digestif et les ganglions mésentériques.

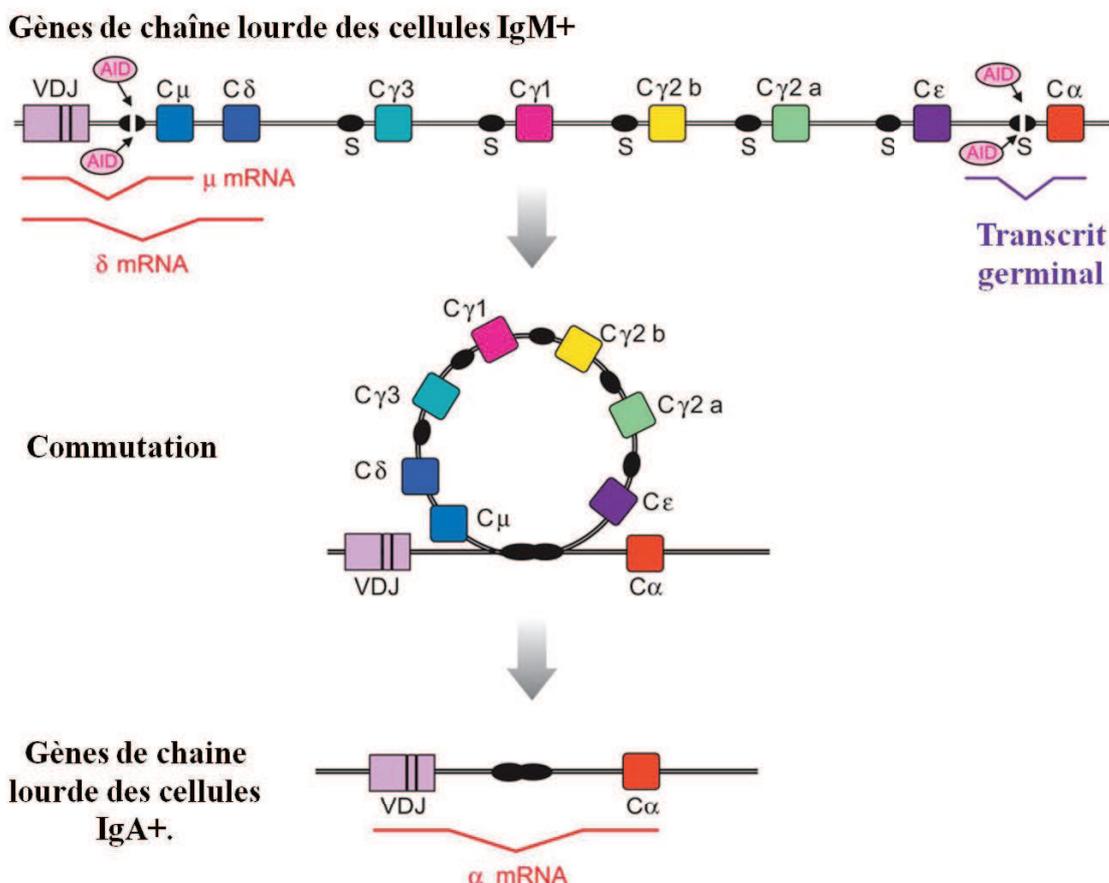


Figure 18 : Mécanisme de la commutation de classe des immunoglobulines chez la souris.

2.6.2.1 Rôle des cytokines dans la commutation de classe des cellules B

La commutation isotypique dépend de l'antigène et de l'environnement cytokinique [429, 430]. Chez l'homme, il y a 5 classes de régions constantes IgM, IgD, IgE, IgG et IgA dont les deux derniers se répartissent en sous classes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2. Ces isotypes se différencient par leurs propriétés physicochimiques, biologiques et leurs fonctions.

IgA :

Les sous-classes d'IgA humaine (IgA1 et IgA2) sont codées par 2 gènes séparés (distincts) pour lutter contre des antigènes différents. L'IgA1 neutralise souvent les antigènes protéiques tandis que l'IgA2 cible plutôt les polysaccharides.

De plus, ces sous classes ont une répartition différente. L'IgA1 est la forme dominante dans le sérum (90% IgA sérique), la rate, les ganglions lymphatiques, la muqueuse de l'intestin grêle tandis que l'IgA2 se trouve surtout dans les glandes salivaires et la muqueuse du gros intestin [431]. Le TGF- β 1 peut guider la commutation de classe directe de l'IgM vers l'IgA en induisant les transcrits germinaux correspondants [432, 433] avec une expression préférentielle de l'IgA1 [432]. Le mécanisme responsable de l'expression sélective d'IgA1 ou IgA2 reste inconnu. Les promoteurs des 2 sous classes ont une similarité de 98% et répondent pareillement au TGF- β 1 suggérant l'absence d'une séquence caractéristique ou restreinte à une sous classe [434, 435]. Pourtant, des hypothèses suggèrent l'intervention d'un mécanisme

TGF- β indépendant qui nécessite les séquences de l'activateur 3' [436-438]. Il semble que le TGF- β ne soit pas le seul facteur déterminant la production d'IgA. Bien que le TGF- β soit présent dans plusieurs situations physiologiques ou inflammatoires, l'expression d'IgA est généralement restreinte aux muqueuses [439]. La commutation vers l'IgA peut être directe ou séquentielle [440]. Toutefois, elle nécessite le contact avec les cellules T CD4+.

Les patients ayant une mutation ou délétion du gène C μ ont aussi de faibles taux sérique d'IgA et sont soumis à un grand risque d'infections respiratoires. Ces infections sont associées à l'absence d'IgA dans la salive, l'intestin, et la muqueuse nasale [441, 442].

IgG :

Les IgG se répartissent en 4 sous-classes qui sont présentes dans le sérum humain en différentes proportions : IgG1 (66%), IgG2 (24%), IgG3 (7%), IgG4 (3%) [443, 444].

De même que pour l'IgA, on ne peut pas déterminer un facteur unique responsable de la commutation vers chaque sous-classe. Cependant, plusieurs cytokines peuvent favoriser l'expression d'une sous classe particulière lors de la stimulation de la voie CD40.

L'IL-4 stimule la production d'IgG4 et d'IgE par les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) mais pas des cellules B purifiées [445, 446]. La combinaison d'anti-CD40 et d'IL-4 induit la commutation en IgG1, IgG3, IgG4 [447, 448] tandis que l'association anti-CD40 et IL-10 stimule la production d'IgG1 et d'IgG3 par les cellules B purifiées mais pas celle d'IgG4 [448, 449]. L'IgG4 est l'isotype le plus dépendant de l'IL-4. Bien que la combinaison IL-4 et IL-10 amplifie la production d'IgG4, elle inhibe la synthèse d'IgE [450]. L'IFN- γ et l'IL-6 coopèrent pour amplifier la production d'IgG2 tandis qu'elles sont antagonistes pour la production d'IgG1 dépendante de l'IL-6 [451].

Quel que soit l'environnement cytokinique, l'interaction CD40-CD40L est indispensable pour toute commutation de classe d'Ig. La déficience en CD40 ou CD40L entraîne le syndrome d'hyper-IgM [452, 453].

En résumé, la combinaison de plusieurs facteurs peut favoriser et stimuler l'expression des différentes sous-classes d'IgG [448]. Par exemple, chez les patients déficients en IgA ou avec un déficit immunitaire commun variable (CVID commun variable immunodeficiency), la combinaison IL-10 et anti-CD40 conduit à la sécrétion d'IgA et IgG en quantité normale [454-456].

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Références
IL-4	X		X	X	[430, 461]
IL-10	X		X	X	[462, 463]
IFN- γ		X			[430]
TGF- β					[464]
IL-21	X		X		[465]

Tableau 2 : Cytokines et expression des sous classes d'IgG. Les interleukines 4 et 10 (IL-4 et IL-10) favorisent l'expression de différentes sous classes sauf l'IgG2 qui est induit par l'IFN- γ . L'IL-21 stimule la production d'IgG1 et d'IgG3. Par contre, le TGF- β n'a pas d'effets sur la synthèse de différentes IgG.

IgE

C'est l'isotype connu par sa capacité d'activer les mastocytes et les réactions d'hypersensibilité. La synthèse d'IgE nécessite 2 signaux. Le premier est assuré par les cytokines tandis que le second requiert l'interaction T-B [457].

L'IL-4 induit la sécrétion d'IgE par les LB humains périphériques non purifiés. La présence de monocytes ainsi que d'IL-5 et d'IL-6 optimise et amplifie l'expression d'IgE induite par l'IL-4. La production d'IgE est complètement bloquée par des Ac ciblant l'IL-4 tandis qu'elle est partiellement réduite lors de la neutralisation de l'IL-6. En conclusion, la synthèse de l'IgE nécessite la présence d'IL-4.

Bien que l'IL-5 amplifie la sécrétion d'IgE dépendante de l'IL-4, son effet direct sur les cellules reste inexpliqué [445]. Les cellules B purifiées sont incapables de produire de l'IgE dans différentes conditions de culture, confirmant ainsi le caractère obligatoire de l'interaction T-B pour cette commutation [458, 459].

D'ailleurs, la présence d'IFN- γ ou α inhibe la production d'IgE stimulée par l'IL-4 [460].

2.7 Différenciation terminale en lymphocytes B mémoires et plasmocytes

La cellule B de haute affinité est sélectionnée dans le CG pour continuer sa différenciation en cellule mémoire ou plasmocyte sous l'effet de plusieurs cytokines [358].

Bien qu'on ne connaisse pas les facteurs responsables pour chacune des voies de différenciation (cellule mémoire, plasmocyte), il semble que le chemin emprunté par les cellules post CG dépend de la stimulation antigénique ainsi que des signaux reçus de différentes cellules (LT, CD).

2.7.1 Lymphocyte B mémoire

Les lymphocytes mémoires persistent pour longtemps même en absence d'antigène. Ils migrent du CG vers les tissus périphériques et les sites d'inflammation assurant une réponse humorale rapide et neutralisante [370].

Au contraire des cellules B naïves, les cellules B mémoires sont caractérisées par leur expression d'Ig mutées de haute affinité [466]. Pourtant, il y a une fraction des cellules mémoires qui peut exprimer la molécule CD20 qui est utilisée comme marqueur des lymphocytes B naïfs [467]. En plus des marqueurs classiques des LB, ces lymphocytes expriment constamment [468, 469] un antigène particulier nommé CD27 qui est stimulé par CD70 présent sur les LT activés [470]. Le marqueur CD27 est acquis pendant la migration des cellules B vers la zone folliculaire [471]. Une petite fraction de LB mémoire CD27⁺ a aussi été identifiée [472]. D'autre part, les cellules B MZ expriment aussi la molécule CD27 remettant en question sa validité comme marqueur de cellules mémoires [473]. Le maintien de l'expression du CD27 au cours de la différenciation des cellules B est discuté. Des études le considèrent comme un marqueur exclusif des LB mémoires [474] alors que des travaux récents ont montré sa persistance sur les plasmocytes [470].

Les patients atteints du syndrome hyper-IgM, ont un déficit de formation des CG et de production des cellules B mémoires. Pourtant, ils gardent toujours une fraction de cellules B CD27⁺ circulantes [365, 394]. Ces études suggèrent que le CD27 est exprimé par des cellules autres que les cellules mémoires.

Bien que la fonction de la molécule CD27 ne soit pas clairement définie, sa signalisation est indispensable à la différenciation des cellules B en plasmocytes [474, 475]. Une étude récente

a montré que les cellules B mémoires sont caractérisées par l'absence du transporteur ATP-binding cassette B1 transporter (ABC B1) présent sur les cellules B naïves.

En conclusion, c'est la classification multiparamétrique qui peut nous aider à identifier les vraies cellules B mémoires.

Après leur différenciation, les cellules B mémoires rejoignent les cellules B circulantes et colonisent différents tissus.

2.7.2 Plasmocyte

C'est une cellule différenciée, spécialisée dans la sécrétion d'anticorps. Cette voie de maturation (centrocyte-plasmocyte) est régulée par plusieurs facteurs dont BCL-6 et Blimp-1 sont les plus importants [370]. L'expression de Blimp-1 est corrélée avec les étapes finales de la différenciation plasmocytaire des LB. Elle est nécessaire à la sortie du CG [476]. Blimp-1 est un répresseur transcriptionnel qui inhibe l'expression de certains facteurs tels que BCL-6, Pax5 ainsi que les modifications des immunoglobulines. Par ailleurs, Blimp-1 empêche le retour en arrière des plasmocytes (figure 19) [370]. Par contre, BCL-6 et Pax5, surexprimés dans la phase de CG, réprime la transcription des gènes impliqués dans la différenciation terminale des LB. BCL-6 et Blimp-1 sont engagés dans une boucle de rétrocontrôle négatif [404, 470, 477].

La différenciation plasmocytaire est complexe. Elle nécessite une interaction T-B qui recrute les 2 couples CD40/CD154 et OX40/OX40L [358]. Des cytokines sont aussi impliquées dans cette différenciation comme l'IL-6, l'IL-10, l'IL-2 [370, 478].

Les cellules plasmocytaires immatures produites dans les follicules secondaires sont appelées plasmablastes [360]. Quoique cette population (plasmablaste) minoritaire dans le CG ait un phénotype proche de celui des plasmocytes [476], elle est caractérisée par sa prolifération intense et l'absence du CD138 (CD20⁻ CD19⁺ CD138⁻) [479, 480]. Ces plasmablastes vont se différencier en cellules faiblement prolifératives et résistantes à l'apoptose appelées plasmocytes [332, 479, 481]. Ces derniers expriment des Ig intracellulaires mais pas membranaires. Cette différenciation plasmocytaire est accompagnée par l'expression de 2 marqueurs spécifiques CD38 [479, 480], et CD138 [479, 480, 482].

La maturation plasmocytaire se fait également lors de la migration de ces lymphocytes pour se domicilier dans la moelle osseuse ou la lamina propria de la muqueuse gastro-intestinale. L'attraction vers la moelle osseuse est contrôlée par un gradient de la chimiokine SDF (stromal cell derived factor, CXCL12) produite par les cellules stromales [483]. L'interaction SDF-1/CXCR4 fournit des signaux de maturation aux plasmablastes et de survie aux plasmocytes [484]. La domiciliation des plasmocytes est stabilisée par des molécules d'adhésion comme la E- sélectine (endothelial-cell selectin) et VCAM-1 [370].

Au contraire de celle du récepteur CXCR4, l'expression de CXCR5 et CXCR7 diminue favorisant l'émigration vers la moelle osseuse. Ces 2 récepteurs sont responsables de la résidence dans les CG et organes lymphoïdes secondaires [370, 479].

En conclusion, la survie des plasmocytes dépend plutôt de leur environnement que de leurs propriétés intrinsèques [374].

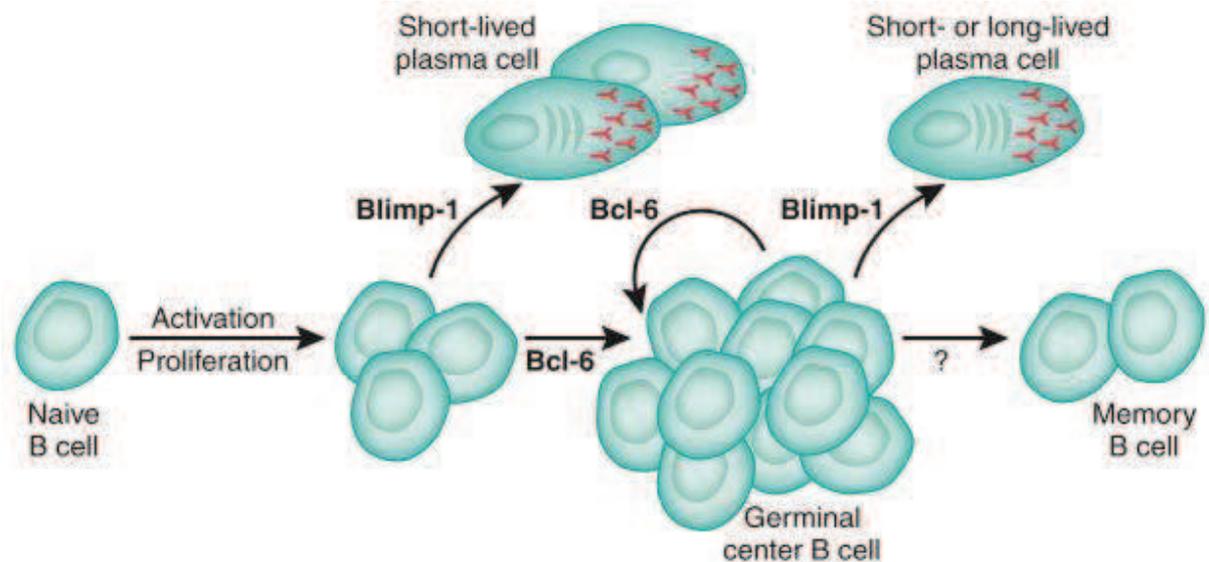


Figure 19 : Rôles de BCL-6 et Blimp-1 dans la différenciation des cellules B [404].



	naïf	Plasmablaste	plasmocyte	mémoire
CD19	+	+	+/-	+
CD20	+	-	-	+/-
CD138	-	-	+	-
CD38	+/-	+++	+++	+/-
CD27	-	-	-	+
CD27*	-	+	+++	+++
CD79b	+	+	+	+
BCL-6	-	-	-	-
Pax5	+	+	-	-
Blimp	-	+/-	-	-

Tableau 3 : Marqueurs de surface des lymphocytes B humains à différents stades (naïf, plasmablaste, plasmocyte, mémoire). * La signature du marqueur CD27 est discutable. Bien qu'il ait été considéré comme un marqueur pertinent des cellules mémoires dans la lignée B, des études récentes ont montré également de son expression à des stades avancés (plasmablastes et plasmocytes) [480, 482, 485].

2.8 Régulation de la transcription :

La régulation de la transcription des gènes d'Ig implique des séquences nucléotidiques consensus et des éléments régulateurs qui peuvent contrôler l'accessibilité de la machinerie enzymatique de recombinaison et du réarrangement VDJ (exclusion allélique). L'interaction entre les différents facteurs contrôle l'expression et la spécificité de la production d'Ig par les LB [486]. Il est possible de distinguer parmi ces éléments régulateurs :

2.8.1 Promoteur VH

Des promoteurs existent en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig à l'exception de C δ . Ces promoteurs, faiblement actifs, régulent l'accessibilité du locus. Cependant le promoteur en amont du VH réarrangé est fortement activé lors de la

transcription. Il comporte une séquence consensus conservée TATA et une séquence octamère impliquée dans la spécificité cellulaire. Cette dernière est inversée entre les chaînes lourdes et les chaînes légères [487, 488]. De plus, ces activateurs transcriptionnels déterminent la spécificité cellulaire des gènes d'Ig. En résumé, le promoteur contrôle l'accessibilité aux régions VH en configuration germinale et régule l'expression des chaînes lourdes assemblées.

2.8.2 Activateur transcriptionnel intronique E μ

L'activateur principal est localisé dans l'intron séparant les régions J des régions constantes. La délétion de cet intron est associée à une réduction du taux de réarrangement et de transcription [489, 490]. Pour les chaînes lourdes, cet intron contient une séquence agissant spécifiquement dans toutes les cellules lymphoïdes et qui est constituée d'un octamère et d'un corps. Ce dernier est responsable du fonctionnement de l'activateur durant tous les stades du développement des cellules B [491, 492]. Pourtant, la mutation de l'octamère réduit aussi l'effet activateur [493]

2.9 Les Anticorps : Des molécules effectrices

Les plasmocytes différenciés peuvent sécréter des anticorps de différents isotypes : IgM, IgD, IgG, IgA, IgE. Ces variations isotypiques sont à l'origine des déterminants antigéniques des chaînes lourdes. Il y a également des variations isotypiques des chaînes légères kappa et lambda. Les déterminants allotypiques reflètent les variations des polymorphismes des gènes codant pour les anticorps. Chaque individu peut présenter des allèles différents pour les gènes codants des Ig engendrant des variations allotypiques. L'ensemble des allotypes codés par un même chromosome correspond à un haplotype [494]. En plus, les déterminants idiotypiques permettent de distinguer les anticorps de spécificité similaire. L'idiotype est un marqueur antigénique porté par les régions variables des Igs. Il se situe dans les régions adjacentes aux sites de liaison aux antigènes conférant une signature individuelle aux clones de cellules B.

La spécificité des anticorps réside dans leurs parties variables tandis que leurs fonctions effectrices sont portées par leurs parties constantes. Les Fc des Ig peuvent se lier à des protéines sériques (complément) et à des récepteurs membranaires. Les anticorps permettent de bloquer l'action des agents pathogènes et de favoriser l'élimination de l'antigène suite à l'interaction de la partie Fc avec ses partenaires (complément, FcR).

IgM

L'IgM représente 8% des anticorps sériques. Elle existe soit sous forme membranaire ou sécrétée [495]. L'IgM sécrétée est, à son tour, divisée fonctionnellement en 2 catégories : naturelles et immunes [496]. Au contraire d'autres isotypes, les IgM naturelles sont présentes en quantité normale dans le sérum même en absence de toute stimulation exogène [496]. Ces anticorps sont souvent poly-réactifs et responsables des réactions croisées entre différents antigènes endogènes et exogènes [497].

L'IgM est impliquée dans le cas d'infection, d'inflammation, d'athérosclérose ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie des cellules B [495]. Cet anticorps est capable d'éliminer les débris apoptotiques [495], d'activer la fraction C1q du complément [498, 499] et de se lier au récepteur Fc μ R exprimé sur les lymphocytes (humains et murins) mais pas sur les phagocytes [500, 501]. Néanmoins, il se fixe également sur d'autres récepteurs, tels que le Fc α / μ R, exprimés sur les CFD, les macrophages et les cellules B. Ce dernier récepteur, activé aussi par IgA, inhibe la réponse T-indépendante [502, 503].

IgD

L'IgD est une autre Ig fréquemment trouvée à la surface des cellules B. Quoique sa fonction précise dans le sérum soit inconnue, l'IgD membranaire fournit vraisemblablement des signaux apoptotiques. Après un épissage alternatif, elle est co-exprimée avec l'IgM à la surface de LB mature naïf. Pourtant, une commutation non conventionnelle d'IgM vers IgD pourrait se passer dans la muqueuse respiratoire générant ainsi des LB sécréteurs d'IgD. Cette molécule peut se fixer (réaction croisée) sur les basophiles et les cellules de l'immunité innée. Bien que le récepteur de l'IgD ne soit pas caractérisé, sa stimulation déclenche la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs anti-microbiens.

IgG

Les fonctions effectrices des différents isotypes d'IgG dépendent de leur demi-vie et de leur affinité pour les Fc récepteurs.

La nature de l'antigène joue vraisemblablement un rôle dans la sélection de l'isotype exprimé. Les IgG1, IgG3 [504] et IgG4 [505-507] ciblent souvent des antigènes protéiques TD tandis que l'IgG2 est dirigé contre les antigènes polysaccharidiques dans le cas d'une réponse TI [430, 461, 505-508]. Les IgG1 et IgG3 sont marqués par leur haute affinité pour le composant C1q du complément et le récepteur FcγRI [192]. L'IgG3 est rapidement dégradée par les protéases et a donc une demi-vie courte [504]. Par ailleurs, l'IgG4 est impliquée dans les maladies allergiques et les maladies chroniques [505-507].

La majorité des sous classes d'IgG peut se lier à des récepteurs FcR exprimés à la surface de différentes cellules telles que les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales et les neutrophiles [509]. Cette fixation coopérative stimule la signalisation du récepteur, aboutissant à l'endocytose du complexe immun (Ag-Ac). Les antigènes des complexes immuns internalisés peuvent être détruits ou présentés avec les molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [510, 511].

Tous ces récepteurs Fc sont des activateurs caractérisés par leurs motifs ITAM (immuno-tyrosine based activation motifs) à l'exception du récepteur inhibiteur FcγRIIb ayant un motif ITIM (immuno-receptor tyrosine-based inhibition motif) [512, 513]. Ces récepteurs (ITAM et ITIM) sont co-exprimés sur la majorité des cellules immunitaires innées et adaptatives. Ces FcR confèrent aux anticorps des propriétés inflammatoires (FcR activateurs) ainsi qu'anti-inflammatoires et régulatrices (FcR inhibiteurs) [514]. La réponse finale intègre les différents signaux provenant des récepteurs exprimés sur une cellule. Toute perturbation de cet équilibre peut engendrer des maladies auto-immunes. Cependant, quelques populations de cellules immunitaires expriment préférentiellement et sélectivement un type déterminé de récepteurs. Les LB expriment souvent le récepteur FcγRIIb tandis que les NK expriment principalement le FcγRIIIa et dans de moindres proportions le FcγRIIb [515]. Les LT n'expriment pas de FcR.

Les effets biologiques de l'activation de Fc dépendent des cellules cibles (NK, granulocytes). La fixation d'IgG sur le récepteur FcγRIIIa des cellules NK active la voie ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity) conduisant au relargage de médiateurs cytotoxiques induisant la mort cellulaire [516]. Les affinités pour les différents FcγR dépendent des sous classes d'IgG.

Le Fc γ RIIB des cellules B contrôle l'activation et la survie des cellules B et des plasmocytes [517, 518]. Il permet la sélection des clones de haute affinité [516]. La déplétion de ce récepteur induit le développement de maladies auto-immunes murines [519] et est associée à une augmentation des taux d'anticorps de faible affinité [520]. Ces résultats sont vraisemblablement aussi valables chez l'homme. Les patients atteints de pathologies auto-immunes humorales montrent une faible expression de ce récepteur [521, 522] associée à une augmentation du nombre des plasmocytes [518]. En résumé, le Fc γ RIIb contrôle l'homéostasie des cellules B activées et la nature de la réponse (qualité des anticorps) [523].

A noter qu'il y a d'autres récepteurs qui transmettent les effets anti inflammatoires des IgG parmi lesquels SIGN-RI (specific ICAM-grabbing non-integrin receptor) qui est exprimé sur les macrophages de la zone marginale [524] et les cellules dendritiques [525]. L'activation de ce récepteur par les Fc γ sialylées induit la sécrétion des cytokines (IL-33 et IL-4) qui, à leur tour, inhibent l'expression des récepteurs activateurs Fc γ R [525-527].

	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	Références
Masse moléculaire (kDa)	146	146	170	146	[528]
% des IgG sériques	66	24	7	3	[461]
Demi-vie (jours)	21	21	7	21	[461]
Activation du complément (voie classique)	++	+	+++	-	[377]
Réaction avec le C1q	6X	1X	40X	0	[528]
Liaison aux phagocytes (FcR)	+	-	+	-/+	[377]

Tableau 4 : Caractéristiques des sous-classes d'IgG humaines

IgA

Elle est la première ligne de défense contre les microorganismes. Bien que l'IgA sérique soit minoritaire et monomérique (15%), elle est dominante et dimérique dans les sécrétions muqueuses et les voies respiratoires [529].

L'IgA assure la protection par des mécanismes directs et indirects. Elle peut induire la tolérance, l'exclusion immune et activer ses propres récepteurs. Le FC α R1 ou CD89 est le récepteur le plus important de l'IgA [530] avec une expression diversifiée sur les cellules myéloïdes, les monocytes, les macrophages et surtout sur les neutrophiles [531, 532] indépendamment de la présence d'IgA [533]. L'IL-8 et le TNF- α induisent l'expression de ce récepteur sur les neutrophiles [534] tandis que le GM-CSF stimule son expression sur les monocytes et les macrophages. L'activation du Fc α RI entraîne son association avec le FC γ R [535] qui est l'élément transducteur des effets du dimère formé [536]. Cependant, le Fc α RI existe comme 2 isoformes dont une seule est capable de stimuler la production cytokinique

pro-inflammatoire des neutrophiles humains en l'absence de Fc γ R [537, 538]. Donc, ce récepteur maintient la balance de la réponse immunitaire en modulant l'inflammation. En résumé, le récepteur CD89 induit la phagocytose des complexes immuns [539], l'ADCC [540] et la clairance des IgA sériques [530]. Il neutralise les pathogènes et empêche leur entrée dans l'organisme par un mécanisme appelé exclusion immunitaire. Au contraire du FC α monomérique, la polymérisation du récepteur conduit à l'activation cellulaire [536].

Il y a également d'autres récepteurs pour les IgA tel que FC α / μ R exprimé sur les LB, macrophages. Il est responsable de l'endocytose des bactéries opsonisées par les LB murines [503]. La molécule CD71 est un autre récepteur mésangial spécifique de l'IgA1 mais pas de l'IgA2 [541]. Il est à l'origine des dépôts sélectifs d'IgA1 dans la néphropathie humaine [541, 542]. Enfin, le récepteur ASGP (asialoglycoprotein receptor), exprimé par les cellules hépatiques, qui reconnaît les résidus galactoses d'IgA [543]. Il est impliqué dans la clairance d'IgA surtout d'IgA2 [544]. A noter que les polymères d'IgA peuvent se lier à des récepteurs présents au pôle basal des cellules épithéliales de la muqueuse qui vont constituer la pièce sécrétoire ajoutée aux régions Fc. Ils ont la capacité de neutraliser les pathogènes intracellulaires (tels que les virus de la grippe, de la rougeole, de l'immunodéficience humaine) dans les cellules épithéliales ainsi que les infections dans la lumière intestinale [545-548].

Bien que l'IgA soit un faible activateur de la voie classique du complément [549], il est capable d'activer la voie alterne [550, 551] et la voie des lectines [552]. (L'importance de cette activation reste incertaine). Enfin, l'IgA est l'isotype le plus efficace pour recruter les neutrophiles, qui représentent la population cytotoxique majeure humaine pour la lyse tumorale et cellulaire [553, 554].

IgE

C'est l'isotype le moins abondant dans le sang parce qu'il est souvent associé à ses récepteurs (FC ϵ RI, FC ϵ RII) [555, 556].

L'expression du récepteur de haute affinité FC ϵ RI sur les basophiles et mastocytes est responsable des réactions d'hypersensibilité immédiate [557]. Il induit la libération mastocytaire des médiateurs vasoactifs et cytokines inflammatoires [558, 559]. En revanche, son expression sur les CPA permet le transfert des antigènes cibles aux ganglions lymphatiques périphériques afin d'induire une réponse immunitaire [560].

Le CD23 ou FC ϵ RII, récepteur de faible affinité pour l'IgE, existe sous forme membranaire ou sécrétée [560]. On peut distinguer 2 isoformes : CD23a et CD23b. Cette dernière est exprimée sur différentes cellules telles que les lymphocytes T, les CD, les monocytes, les neutrophiles et les cellules épithéliales [561]. Par contre, l'expression du récepteur CD23a est restreinte et presque exclusive aux cellules B et sert comme régulateur de la propre sécrétion d'IgE [561, 562]. L'interaction CD23-CMHII favorise la dégradation des antigènes en peptides présentables aux LT CD4+ [561, 563, 564]. Les complexes immuns amplifient la réponse immunitaire de 100 fois par rapport à l'antigène administré seul [565, 566]. A noter que l'IgE est également impliquée dans l'immunité anti parasitaire [567].

	IgA	IgG	IgM	IgD	IgE	Références
Masse	160	150	160	184	188	[377]

moléculaire (kDa)						
% Ig sériques)	7-15	85	5	0,3	0,02	[374]
Demi-vie (jours)	6	7-21	10	3	2,5	[374, 377]
Activation du complément (voie classique)	-	+	+	-	-	[377]
Transfert placentaire	-	+	-	-	-	[377]
Liaison aux phagocytes	+	+	-	-	+	[377]

Tableau 5 : Caractéristiques des différents isotypes d'anticorps humains.

2.10 B régulateurs de l'immunité (sécrétion des cytokines)

Bien que la sécrétion des anticorps soit la fonction majeure des cellules B, elles peuvent contrôler la réponse immunitaire par d'autres fonctions [568, 569]. Elles peuvent présenter les antigènes aux cellules T, organiser les structures lymphoïdes tissulaires et sécréter des cytokines [570].

2.10.1 Sécrétion de Cytokines

Les LB humains activés produisent un large spectre de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF, LT- α), et anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10) et de facteurs de croissance hématopoïétique (G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor), GM-CSF) [571]. Ces cytokines peuvent moduler les fonctions des macrophages et des cellules dendritiques (TNF- α , IL-6, GM-CSF activateurs et IL-4, IL-10, TGF- β inhibiteurs), des cellules NK (IFN- α et γ), et des LT (IL-1, TNF- α , GM-CSF). Elles participent aussi au chimiotactisme des cellules inflammatoires (G-CSF, GM-CSF, IL-8)[571].

La sécrétion cytokinique permet de distinguer 2 types de cellules B : Breg (régulatrices) et Beff (effectrices) [572, 573]. Breg sont caractérisés par leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- β tandis que les Beff produisent soit des cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-12) et sont nommées Be1, soit des cytokines de de type Th2 (IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α) et sont appelées Be2 [568, 572]. Les cellules Be-1 humaines sont détectables dans le sang périphérique, les amygdales et les tissus lymphoïdes [574-576] alors que les cellules Be-2 sont présentes dans les centres germinatifs et les tumeurs des fosses nasales [303, 577, 578]. L'origine de ces sous populations reste à déterminer. Les souris déficientes en cellules B MZ sont tout à fait capables de produire des cellules B effectrices Be1 et Be2 [568]. D'ailleurs, la stimulation des TLR induit la sécrétion d'IFN γ par les cellules B FO mais pas par les cellules MZ [579]. Une étude récente a établi ces données en montrant une grande susceptibilité des cellules B FO à sécréter les cytokines IFN γ , IL-12, IL-4 et l'IL-2 [580]. Ces données suggèrent que les cellules B FO se comportent comme des cellules effectrices sécrétrices de cytokines. Ces 2 types de cellules ont des voies de différenciation distinctes. Le développement des cellules Be-1 dépend de l'activation du facteur de transcription T-bet et du récepteur de l'IFN γ [581]

alors que la formation des lymphocytes Be-2 est liée à la signalisation du récepteur de l'IL-4 [582]. La différenciation des cellules Be2, mais pas Be1, est T-dépendante [581]. Cependant, les cellules Be-1 sont impliquées dans la différenciation plasmocytaire [582].

Quoique le rôle des Beff dépende du contexte et varie selon la maladie, les B reg gardent toujours leur activité suppressive [573]. Ces cellules, productrices d'IL-10, sont protectrices dans plusieurs maladies auto-immunes tels que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) [583, 584], l'arthrite [585, 586], et lors des infections [587, 588]. Le TGF- β sécrété par les LB a été aussi décrit comme un facteur régulateur [589, 590] stimulant la différenciation et la formation des Treg [591]. Cependant, les différentes sous populations B1a, FO B, MZ peuvent sécréter également de l'IL-10 et de se comporter comme des Bregs [573]. La stimulation des TLR des lymphocytes B1a murins induit leur sécrétion d'IL-10 entraînant ainsi une diminution des cytokines Th1 et l'amplification de la réponse Th2 [592, 593]. Ces cellules B1a constituent la majorité des cellules Breg chez les souris nouveau-nées mais pas chez les adultes [594]. Les lymphocytes Breg d'adultes expriment les marqueurs CD1d et CD19 ressemblant plutôt à des cellules B MZ [578, 595]. Ces différences sont liées à l'environnement cytokinique qui contrôle la différenciation des cellules B. Bien que l'IFN-I amplifie la production d'IL-10 par les B1a néonatales, il stimule la production cytokinique des cellules Beff chez les adultes [594].

La balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires produites par les cellules est un élément déterminant de la réponse immunitaire. Toute perturbation de cette balance peut engendrer l'apparition de maladies.

Les effets bénéfiques de la déplétion B par l'anti-CD20 dans plusieurs maladies auto-immunes (arthrite, lupus érythémateux disséminé LED) reflètent l'effet modulateur des cellules B durant l'inflammation [570]. La sclérose en plaque (SEP) est marquée par la chute de la sécrétion d'IL-10 par les cellules Breg [596] tandis que le lupus est associé à l'hyperproduction d'IL-10 par les cellules B MZ [597, 598]. Les cellules B reg sont aussi impliquées dans la lutte contre les infections (virales et bactériennes) et l'immunité anti-cancéreuse [599]. Le TNF- α et la lymphotoxine agissent comme des facteurs autocrines de croissance des cellules B et des lymphomes de Burkitt [600]. Les cellules B isolées des patients, ayant une maladie auto-immune (hypergammaglobulinémie, maladie de Castleman, gammopathie IgM), secrètent des taux élevés d'immunoglobulines autant que d'IL-6 et de TNF- α [601]. La cellule B est la source majeure d'IL-6 qui aggrave les maladies auto-immunes (surtout dans les maladies du système nerveux) [291] et la maladie parodontale [602] expliquant ainsi l'effet bénéfique de la déplétion des cellules B. La sécrétion cytokinique varie quantitativement et qualitativement d'une pathologie à l'autre. Les cellules B secrètent constitutivement de l'IL-8 dans la maladie de Crohn et la maladie parodontale, stimulant ainsi l'accumulation de neutrophiles et l'aggravation de la maladie. Des études récentes indiquent que les cellules B produisent des taux élevés d'IL-1 β et de TNF- α dans les maladies inflammatoires [602]. En plus, la neutralisation du TNF- α inhibe la sécrétion d'IL-6 et d'IgG par les cellules B sanguines des patients lupiques [603]. Par ailleurs, l'IL-6 et le TNF- α modulent l'expression de virus dans les cellules infectées (HIV) [601].

Les LB peuvent aussi sécréter d'autres médiateurs comme le RANKL qui induit la différenciation des ostéoclastes et la destruction de l'os, indépendamment des LT [602].

En résumé, la sécrétion cytokinique des cellules B dépend du contexte. Elle varie selon les conditions physiologiques [604]. En plus, la localisation des cellules B peut jouer un rôle

important dans la maintenance de l'inflammation chronique. L'infiltration tissulaire des cellules B, à des stades précoces, suggère la contribution de cellules B au recrutement d'autres cellules inflammatoires via la sécrétion de cytokines (obésité, diabète type 2). Par contre, les cellules B sont dominantes seulement à des phases avancées de la maladie parodontale [602].

2.10.2 Présentation d'antigènes

La cellule B peut contribuer aux maladies auto-immunes en se comportant comme CPA qui régule l'activité des cellules T. Cette interaction a été le sujet de nombreuses études. La déplétion des cellules B réduit l'activation des cellules CD4⁺ murines [605, 606]. Les LB sont capables de moduler l'activité des cellules T par un mécanisme nécessitant un contact cellulaire ainsi que par la sécrétion cytokinique (TNF- α) [303]. Les LB agissant comme CPA induisent la différenciation et l'activation des cellules T effectrices [568, 574, 607].

Elles expriment également plusieurs molécules co-stimulatrices telles que B7, CD40 et OX40L qui maintiennent l'activation des cellules T [608, 609].

Donc, les cellules B peuvent agir avec grande efficacité comme des cellules présentatrices d'antigènes. Elles contrôlent la polarisation et modulent l'activation des cellules T (par la sécrétion de cytokines telles que l'IFN- γ , l'IL-4 et l'IL10) [591].

2.10.3 Néo-organogénèse

Les cellules B sont compétentes pour entraîner la formation de structures lymphoïdes tertiaires dans les sites d'inflammation. Le déficit en cellules B altère les structures lymphoïdes locales (tissulaires) et systémiques (ganglions, organes lymphoïdes secondaires), réduit le nombre des follicules lymphoïdes spléniques [610] et entraîne l'absence de plaques de Peyer chez les souris [611, 612]. En outre, la déplétion des cellules B par l'anti-CD20 supprime les formations ectopiques déjà existantes dans l'arthrite humaine et murine [613].

Les cellules B secrètent du TNF- α et de la LT- α qui contrôlent le développement des cellules folliculaires dendritiques [293, 614] et des follicules B [615] dans différents organes cibles des maladies auto-immunes [616]. Bien qu'il y ait plusieurs cellules capables de sécréter la LT- α [292], sa propre sécrétion par les LB est essentielle et suffisante pour la formation de CGF ainsi qu'à la mise en place d'une réponse humorale efficace (primaire, secondaire et mémoire). En résumé, la cellule B assure un signal (LT- α) qui induit et maintient la formation du CG et qui permet la maturation des LB dans ces néo-structures [293, 294]. Les lymphocytes T déficients en LT- α peuvent contribuer à la formation du CG et la maturation périphérique normale des LB (commutation de classe) [293].

La contribution des LB à la formation des organes lymphoïdes a été élucidée dans les plaques de Peyer et l'intestin. Les cytokines LT- α et TNF- α libérées par les cellules B sont indispensables pour maintenir les follicules lymphoïdes [294, 296].

Ces formations lymphoïdes constituent des sites locaux d'inflammation, d'activation et de différenciation des lymphocytes T et B. Des formations lymphoïdes tertiaires avec des zones organisées de cellules B sont détectées dans la synoviale des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, les glandes salivaires dans le cas du syndrome de Sjogren, les reins des patients lupiques et au voisinage des ventricules cérébraux dans les patients atteints de SEP [617-621].

RESULTATS

CHAPITRE 3 :

ARTICLE 1

3 Article 1. Characterization of resident B cells of vascular walls in human atherosclerotic patients.

Characterization of resident B cells of vascular walls in human atherosclerotic patients.¹

Running title: Adventitial B lymphocytes in human atherosclerosis

Moustafa HAMZE *², Caroline DESMETZ *³, Marie Laurence BERTHE †, Pascal ROGER ‡ §, Nathalie BOULLE †¶, Pascal BRANCHERAU ||, Eric PICARD ||, Caroline GUZMAN *, Claire TOLZA *, Paul GUGLIELMI *

* Centre de Pharmacologie & Innovation dans le Diabète FRE 3400 CNRS Montpellier France

† Laboratoire de Biologie Cellulaire et Hormonale, CHU Arnaud de Villeneuve Montpellier France

‡ Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques CHU Carémeau Nîmes France

§ Université Montpellier 1

¶ Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM, U896, Montpellier France

|| Service de chirurgie vasculaire CHU Carémeau Nîmes France

Corresponding author:

Paul GUGLIELMI, MD PhD

Centre de Pharmacologie & Innovation dans le Diabète (CPID) FRE 3400 CNRS

Faculté de Pharmacie, 15, avenue Charles Flahault, BP 1449, F-34093 MONTPELLIER cedex 5

Phone +33 4.11.75.94.87

Fax +33 4.11.75.95.47

E-mail : paul.guglielmi@inserm.fr

Abstract:

Animal models of atherosclerosis suggest that B cells have contradictory protective or pro-atherogenic effects that are also subset- and context-dependent. To further understand the pathophysiology of human atheroma, we characterized local Ig production and functional properties of resident adventitial B cells in human arterial lesions. Ig repertoires were analyzed by RT-PCR in carotid endarterectomy samples. Cytokine, differentiation marker and transcription factor mRNA expression was studied on adventitial lymphocytes isolated by laser capture microdissection. In adventitia, B lymphocytes constituted diffuse infiltrates or formed small cell clusters. Ig sequence analysis revealed that individual samples contained each a limited number of B cell clones. Functional α and γ mRNAs comprised the majority of H chain mRNAs. Clonal evolution of Ig V regions, expression of the cytidine deaminase AID, clonal H chain switch and an inverted λ/κ ratio of Ig L chain usage indicated that a local differentiation process was taking place in arterial walls. Clonotypic markers revealed different plaque and adventitia Ig repertoires and a B cell re-circulation between adventitia and draining lymph nodes. Most resident B lymphocytes are CD20 negative plasmablasts but lack markers of terminal differentiation to plasma cell (CD138 and Blimp-1). Microdissected adventitial B lymphocytes had an activated phenotype expressing IL-6, GM-CSF and TNF- α whereas IL-2, IL-4, IL-10, M-CSF and IFN- γ were not detected. Oligoclonal adventitial B cells of atherosclerotic patients are mainly mature B2 lymphocytes presenting hallmarks of antigen-driven maturation and could act on inflammation and disease progression directly or by promoting polarization of other immune cells.

Introduction:

Atherosclerosis is characterized by a lipid initiated chronic inflammation of vascular walls involving both innate and adaptive immune cells in the pathophysiologic process (1). Macrophages recruited in tunica intima play a crucial role during initial steps of atherosclerosis by up taking modified lipoproteins (mainly oxidized LDL (oxLDL)⁴) leading to foam cell formation, a hallmark of arterial lesions (2). Macrophages participate to inflammation by secreting cytokines, growth factors and enzymes that increase plaque instability. The adaptive immune system is also involved in atheroma development (3). T cells are present within plaques at all stages of the disease. Activated TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD4⁺ cells constitute the dominant T lymphocyte population in vascular lesions and are mainly of the T helper 1 (Th1) type. Natural regulatory T cells (Treg) or induced peripheral Tregs efficiently inhibit experimental atherosclerosis development in several experimental models whereas Treg depletion aggravates plaque formation (4). Accordingly, immune-mediated inflammation in atherosclerosis has been initially envisioned as solely orchestrated by T cells. However, B cell depletion in animal models has recently challenged this conclusion (5, 6).

B cells home in adventitia of normal arteries as the result of a partially L-selectin dependent physiologic process (7). B lymphocytes represent a minor component of tunica intima in normal as well as atherosclerotic vessels (7-13). However, B lymphocytes and plasma cells accumulate in lamina adventitia adjacent to arterial plaques of human patients and of atherosclerosis prone mice and their number generally parallel the severity of vascular lesions (8-15). The structural organization of the inflammatory infiltrates ranges from solitary cells and small lymphoid cell clusters in early lesions to densely clustered cellular aggregates in advanced atherosclerosis. Such an organization suggests a local B cell maturation. Whether B lymphocytes are a major cell population in these tertiary lymphoid structures remains controversial.

B cells have originally been presented as atheroprotective. Indeed, B cell deficiency in *Ldlr*^{-/-} mice was associated with an increase in arterial lesion area (16). Moreover, splenectomy aggravates plaque formation in aortas of *ApoE*^{-/-} mice whereas reinfusion of splenic B cells limits disease progression (17). Part of the B lymphocyte related protection depends on Ig production. Impaired maturation of innate-like B1 and marginal zone (MZ) B cells producing natural antibodies, and particularly anti-OxLDL IgM of the T15 clonotype, accelerates atherosclerosis in hyperlipidemic mice (18). Presence of protective IgG and IgA has been demonstrated in sera of laboratory animals immunized with OxLDL (19, 20). However, titers of anti-OxLDL IgG correlate well with atherosclerosis severity in mouse models (21-23) whereas findings in humans are controversial (24, 25). Two independent reports have demonstrated the proatherogenic role of conventional B2 B lymphocytes (5, 6). This apparent discrepancy with earlier concepts is likely due to the fact that splenectomy selectively depletes B1a cells whereas anti-CD20 antibodies preferentially target mature B2 lymphocytes (26, 27). Whether B2 cells exert their proatherogenic effects by reducing T lymphocyte activation or from their own right is still an unresolved question. Recently, the protective role resident B lymphocytes in diseased arterial wall was shown to be subset- and context-dependent (28).

Herein, we have characterized Ig repertoires and functional properties of arterial wall infiltrating B cells in advanced human atherosclerosis, with a special emphasis on the adventitial population. We demonstrate that most resident B lymphocytes expressed switched

isotypes of Ig heavy (H) chains (frequently and sometimes exclusively of the IgA type) that also featured hypermutated variable (V) regions. B cell responses were oligoclonal with a bias for a recurrent utilization of some particular V region genes. Clonal diversification of V regions by additional somatic mutations, clonal H chain switch, inversion of the λ/κ ratio of light (L) chain usage and activation-induced cytidine deaminase (AID) expression witnessed a skewed recruitment and an in-situ maturation of arterial wall B cells. The resident B2-type lymphocytes were CD20 negative activated plasmablasts expressing IL-6, GM-CSF and TNF- α .

Materials and Methods:

Patients and Surgery: Tissues from patients undergoing carotid endarterectomy (CEA) were obtained from the Montpellier-Nîmes University Hospital. Patients (n=19, 7 women and 12 men) were aged from 52 to 86. They all gave written informed consent according to our university hospital ethical committee guidelines. The surgical procedure to ablate vascular lesions involved dissection through the tunica media. Therefore, the resulting tissue samples further termed “plaque” contain the intima and a portion of the smooth muscle cell layer. A sample of tunica adventitia was obtained from each patient. When requested by the surgical protocol, one of the deep lateral cervical lymph nodes (n=6) was removed and included in our analysis.

Laser-Capture Microdissection (LCM): Carotid endarterectomy samples (n=6, patients 14 to 19) were immediately extensively washed in PBS, immersed in RCL2 fixative (Alphelys, Plaisir, France) and embedded in paraffin as previously described (29). Tissue sections (7 µm thickness) were affixed onto Superfrost glass slides, deparaffinized for 5 minutes in absolute ethanol at 60°C and then stained by hematoxylin and eosin in RNase-free conditions. Sections were then kept in a desiccation chamber for at least 15 minutes. LCM was then performed using a PixCell II apparatus (Arcturus Molecular Devices) of the microdissection platform of the CHU Montpellier, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Hormonale, Hôpital Arnaud de Villeneuve, Montpellier, F-34000 France. The different specimens of patients 14, 16 and 19 were obtained from different sections in temporally independent experiments. Depending on the sample, 60 to 1,340 spots were collected, corresponding to 100 to 2,500 mononuclear cells of lymphocytic appearance. The caps containing the thermolabile polymer-cell composites were affixed on 0.5 ml tubes containing 400 µl of Qiagen® RLT buffer, reversed to maintain contact between cells and buffer for 1 hour at room temperature. To ensure optimal nucleic acid recovery, tubes were subsequently placed 30 min in an oven at 42°C, in wet atmosphere, then vortexed and centrifuged.

Immunohistochemistry: Anti-CD3ε (Confirm™, 2GV6, Ventana) and anti-CD20 (Confirm™, L26, Ventana) monoclonal antibodies were used on 3 µm thick sections of RCL2 fixed tissues. RCL2 is an alcohol based formalin free fixative suitable for subsequent nucleic acid studies but some difficulties may arise and cause discrepancies in immunohistochemical reactivity for certain antigens (30). As indicated by the manufacturer (http://www.alphelys.com/alph01/prod/rcl2/us/rcl2_histo.php) and in our hands too, the use of anti-CD19 or anti-Ig H chain antibodies resulted in inconstant staining, precluding their validation as reliable reagents in this particular experimental setting.

RNA Extraction: Portions of the plaque samples corresponding to intraplaque hemorrhage, thrombosis or necrosis were eliminated to minimize contamination by non-resident cells. Before preparation of whole tissue extracts, adventitia and plaque specimens (n=13, patients 1 to 13) were throughoutly washed with PBS to eliminate blood cells and chopped into small pieces. Tissue fragments were resuspended in Tripure® isolation reagent (Roche) and homogenized with a Polytron® apparatus. Samples were then processed to extract RNAs according to the manufacturer protocol. RNAs were prepared from microdissection samples using Qiagen® QIAshredder system and RNeasy mini kits.

Reverse Transcription: 300 ng RNA (adventitias and plaques) or the totality of extracted RNAs (microdissections) were denatured 5 min at 70°C and reverse transcribed in a total volume of 40 µl containing 2 µl of dNTP mix (10 mM each), 8 µl 5x buffer, 4 µl 0.1M DTT, 1 µl oligo-dT primer (1 µg/µl) and 1 µl Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen®) for, 40 min at 37°C, 40 min at 40°C and 40 min at 42°C. RT was heat inactivated for 15 min at 70°C.

PCR amplification: PCR was carried out with specific primers (see detailed list in Supplemental Fig. S1) and thermostable DNA polymerases (recombinant Taq polymerase, Invitrogen or Ex Taq polymerase, Takara). Reactions (50 µl) were amplified using the following protocol: one cycle of 94°C for 10 min; 26 (32 or 36) cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 30 s and 70°C for 1 min 30 s and one cycle of 10 min at 72°C. In some instances, second-round PCRs were performed with specific immunoglobulin nested primers using the same protocol with 26 cycles. All the primer pairs combinations used in this study yield readily detectable amplification products in single round PCRs (32 cycles) using total spleen cell cDNAs as templates.

The RT-PCR system designed to characterize expressed Ig sequences is based on the utilization of 14 V_H, 13 V_κ and 15 V_λ upstream primers able to amplify almost full-length open reading frames belonging to all known V region families. Reverse primers were chosen sufficiently downstream to allow, when necessary, the unambiguous identification of the classes and subclasses of expressed constants regions.

Cloning: PCR products were characterized on 2% agarose gels, purified as recommended by Quiaquick® and cloned into PCR II Topo vector (Invitrogen). Ligation reactions were transfected to competent E. coli, by heat shock at 42°C for 1 min as recommended by the manufacturer. Transformed bacteria (100 µl) were plated onto LB Petri dishes containing 100 µg/ml ampicillin and 0.17 mg/ml X-Gal.

Plasmid preparation and sequencing: Plasmids were extracted from bacteria following an alkaline lysis protocol. Nucleic acid sequences were commercially purchased from MWG®. Mutation analysis of the variable region sequences were performed using the V Quest software of the international ImMunoGeneTics information system®, (IMGT®, <http://www.imgt.org> (31)). Fully annotated nucleotide sequences of the adventitial Ig H and L chain cDNAs have been deposited in EMBL database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/Access/index.html>).

Results:

1- Lymphoid cells in arterial wall samples:

Plaque specimens were 3 cm long on average and comprised most of the carotid artery circumference which greatly differed in size for each patient. They often contained hemorrhagic, necrotic and calcified areas. Adventitial tissue samples were more homogenous upon macroscopic examination, had a crescent shape (5 mm length, 4 mm maximal width and 2 mm thickness) and weighted 15-30 mg. Due to the discontinuity and heterogeneity in inflammatory elements and fibrous content, total cell count in specimens used for whole tissue RNA extraction were almost impossible to achieve in intimal plaques and could only be determined indirectly in adventitias. For the latter, estimations made from representative hematoxylin-eosin stained slides used for LCM (3 patients) resulted in figures ranging from 5 to 15 10^5 nucleated cells per adventitia specimen. Cells with a lymphocyte or plasma cell morphology accounted for 10% to 30% (plaques; 4 patients) or for 30% to 70% (adventitias; 3 patients) of the total cell content. Immune cells were mainly found close to vasa vasorum and often formed diffuse infiltrates but were sometimes organized in small cell clusters containing up to 400 lymphoid cells (Fig. 1). We did not observe structures that could resemble high endothelial venules.

2- B cells in arterial walls preferentially express IgA and IgG:

In the arterial walls of a first group of 13 patients, an overall assessment of H chain isotype expression was achieved by RT-PCR amplification of Ig transcripts using joining (J) and constant (C) region primers. All adventitial whole tissue extracts but one contained Ig mRNAs whereas 3 plaques lacked completely Ig expression and 2 contained only trace amounts of Ig transcripts (Fig. 2). Alpha H chain mRNAs were present in all adventitia specimens that expressed Ig and were the sole IgH transcripts in 3 cases. In many instances, the JH-C α amplification products appeared as doublets, due to the difference in length between the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ hinge regions, indicating that both isotypes were concomitantly produced. This finding was further confirmed by RT-PCR using α subclass specific primers and digestion of the amplification products with the Pst1 restriction enzyme that cleaves the CH1 $\alpha 1$ but not the CH1 $\alpha 2$ sequence (not shown). Nine adventitial specimens contained γ chain transcripts (Fig. 2). Subclass-specific PCR primers identified the existence of $\gamma 1$ transcripts in all of them whereas $\gamma 2$ mRNAs were found only in 7 samples. Trace amounts of $\gamma 3$ mRNAs were sometimes present and there were no $\gamma 4$ transcripts (not shown). Five adventitia samples contained μ H chain transcripts and low amounts of δ H chain mRNAs were found in 3 of them (Fig. 2). There were no functional ϵ H chain mRNAs. Thus, in a majority of samples, the absence of μ and/or δ mRNAs ruled out a possible blood cell contamination and the isotype distribution was evocative of some degree of selection amongst resident B lymphocytes. This conclusion was also supported by observation of only 4 cases of concordant Ig H chain expression patterns between individual patient adventitia and plaque samples (Fig. 2). Further insights on Ig H chain expression were obtained by analyzing 10 microdissection samples from arterial tissues of a second group of 6 patients. Plaque and adventitia lymphocytes isolated by LCM all expressed at least one H chain isotype. Ig α and γ chain transcripts were indeed predominant and only 2 specimens contained μ mRNAs (Fig. 2). Interestingly, different H chain isotypes were expressed by 2 independent nodular cell aggregates from patient 16: μ type transcripts were exclusively found in the adventitial one whereas a mixture of α and γ mRNAs was present in the intimal one (Fig. 2).

3- Adventitia is populated by low number of B cell clones:

We then examined the Ig VH and VL region repertoires of adventitial B cells in samples representative of different H chain isotype distributions (IgM+G+A producers: patients 4 and 6, IgG+A producers: patients 5 and 9, IgA only producers: patients 10 and 12; none of the selected samples contained δ chain transcripts). Using our RT-PCR amplification system of full length V regions, the total number of amplified bands detectable in each patient adventitia ranged from 2 to 16 for the cumulated H chain isotypes (Fig. 3A), from 0 to 7 for κ L chains and from 2 to 10 for λ L chains (these numbers include consideration of some very weak bands) (Fig. 3B). For a given adventitia, numbers of H and L amplification products were generally in good correlation with sometimes a slight excess of L chains that may be due either to a more efficient amplification of the shorter L chain mRNAs, to certain degree of promiscuity in VL primers or to the presence of non-functional transcripts (see below).

To assess their homogeneity, we cloned and sequenced a number of representative PCR products. The Ig H and L chain transcripts had an open reading frame throughout the entire V(D)J and constant regions (except for 2 independent λ L chain mRNAs from patient 5 that contained a frame shift mutation in CDR3 resulting in the appearance of a premature stop codon in the constant region) and therefore could encode functional proteins. Iterative sequencing of 18 VH PCR products yielded a single sequence in 15 cases and two different sequences in 3 samples. In all cases, the amplified sequences strictly corresponded to the VH (sub-) family specified by the upstream oligonucleotide. Therefore, 83% of the VH amplification products were homogeneous, making the enumeration of DNA bands on agarose gels a fair estimation for the number of B cell clones actually present in the arterial wall samples. DNAs of 13 VL bands (4 κ and 9 λ) were also cloned and sequenced: 50% corresponded to a single sequence and 50% to two sequences. However, several duplicated sequences were explained by some promiscuity within VL oligonucleotides leading to the redundant amplification of certain L chain transcripts. In all adventitias but one (patient 5) there was a majority of Ig λ over Ig κ clones (overall ratio 70.6% λ vs 29.4% κ). Taken together, these results indicate that each adventitial sample contained a limited number of B cell clones.

4- Adventitial B cells preferentially express a limited set of hypermutated VH regions:

When results from all patients under study were aggregated, the majority of expressed V regions belonged to the VH3, VH4 and VH5 gene families (Supplemental Fig. S2). Nevertheless, the observed frequencies were not significantly different from those expected from random gene usage. However, a preferential usage of a small number of specific individual family members accounted for the overrepresentation of VH3 sequences: the VH3-23 gene that is normally expressed by 6-7% of blood B cells (32) contributed for 30% of cumulated adventitial VH3 sequences and was present in the arterial wall samples of 4 out of the 6 analyzed patients. VH3-66 was found in three instances and VH3-73 twice. Thus more than one half (58%) of the VH3-IgH sequences came from only three individual VH genes. Conversely, no particular DH or JH region appeared to be preferentially expressed.

Whereas only two μ H chain mRNAs contained unmodified VH, DH and JH germ-line regions, all the other Ig transcripts featured extensive somatic modifications. In the γ , α and one μ mRNAs, the number of mutations ranged from 7 up to 39 per sequence (average 21) for the sole VH portion. Somatic diversification was further extended by N and P insertions and numerous DH mutations (Supplemental Fig. S2). The VL regions were also targets for

somatic mutations (7-21 per V region in κ chains and 9-21 in functional λ chains) (Supplemental Fig. S2).

5- Arterial wall B cells present hallmarks of local adaptive maturation and selection: Expression of AID was detected in 3 adventitias (whole tissue extracts from patients 3 and 12 and some microdissected cells from patient 16) and two plaques (patients 4 and 6) (Fig. 4 and Supplemental Fig. S3). Interestingly, in patient 16, AID was expressed in the adventitial diffuse cell infiltrate (sample 16b) but was not detected within B cell clusters producing IgM only (adventitial sample 16a) or IgG and IgA (plaque sample 16c). Transcripts resulting from a clonal H chain class switch event were evidenced in patient's 9 tunica adventitia: a fully identical VH-DH-JH sequence was associated either to a C γ 1 or a C γ 2 region (Supplemental Fig. 4). In the same sample, two clonally related IgA1 mRNAs featured a common complementarity determining region (CDR) 3 sequence resulting from a VH3-23-DH2-15-JH4 rearrangement whose formation has necessitated the incorporation of 13 non template (N) nucleotides and 2 mutations in the D region. However, they were representative of two divergent subclones having accumulated independent mutations in FRs and CDR 1 and 2 regions (23 differences leading to 13 amino-acid replacements; Supplemental Fig. 4). Two different IgA1 transcripts from patient 4 and 9 shared the same nucleotide sequence in their VH3-23 portion, including 7 identical mutations in CDR2 and a germ line CDR1. Yet their CDR3 regions were dissimilar, using 2 different DH regions (Supplemental Fig. 4). Within L chain transcripts of different patients, it was also possible, in two cases, to identify common CDR3s either at the DNA or at the protein level (Supplemental Fig. 4). In both instances, the V genes that contributed the final CDR3 sequences were different.

In a limited number of patients, using oligonucleotides specific of individual CDR3 sequences as clonotypic identifiers, we could design RT-PCRs that allowed detection of the traffic of certain lymphocyte clones between adventitias and available draining lymph nodes (Fig. 5). We were able to re-clone, from patient 6 lymph node RNAs, a number of VDJ cDNAs corresponding to the 06_59A and 06_60A prototypes already identified in adventitia. Whereas all the 06_59A related sequences remained fully identical, members of the 06_60A family presented signs of ongoing clonal maturation (Supplemental Fig. 4). Of note, the inserted Arg 60 in somatically diversified 06_60A family sequences is specified by different codons that may indicate a strong selective pressure for the maintenance of this mutation. Using this approach, we also found that plaque and adventitia repertoires were essentially different (Fig. 5 and data not shown) thus confirming the observed difference in H chain isotype expression.

6- Most adventitial B lymphocytes are representative of late stages of differentiation and express pro-inflammatory cytokines:

Immunohistochemical staining by anti-CD3 and anti-CD20 antibodies of arterial wall tissue sections revealed 0.5-2% and <1% positive cells respectively in plaque samples and even lower percentages in adventitia (data not shown). Thus, this combination of T and B cell markers only identified a small proportion of the resident lymphocytes. For there was some uncertainty about arterial wall B lymphocyte surface CD marker detection by immunohistochemical techniques (11, 33, 34) and since anti-Ig reagent utilization could also identify non-B cells bearing Ig loaded Fc-receptors, we decided to microdissect cells in lymphoid infiltrates by simply selecting on morphological criteria. The LCM specimens (5 adventitias and 5 plaques) corresponding to 100 - 2.500 cell equivalents were surprisingly

homogenous in term of lineage marker expression: samples all contained transcripts coding for Igs (Fig. 2) and the short isoform of CD79b whereas CD3 ϵ , CD11b or CD11c mRNAs were under the threshold of detection in our reactions (Fig. 4). This indicated a predominance of B lymphocytes within the LCM samples since T and monocytic cell lineage markers (CD3 ϵ and CD11b transcripts) could be detected in the arterial wall whole tissue extracts (Supplemental Fig. 3). In addition, the captured cells did not contain CD5, CD20 and CD138 transcripts (Fig. 4). This result was confirmatory of data obtained on total arterial mRNAs showing that expression of these molecules was infrequent in arterial wall lesions (Supplemental Fig. 3). CD27 transcripts, were also absent from microdissected B cells (Fig. 4) whereas they were indeed contributed by other cell types in total adventitia extracts (Supplemental Fig. 3). Finally, B cell differentiation reciprocal and antagonistic transcription factors BCL6 and Blimp-1 were not expressed by LCM cells (with one exception for the latter). In summary, adventitial B cells mostly express switched IgH isotypes with hypermutated V region and their phenotype is compatible with their classification as plasmablasts.

Within the complex array of cytokine transcripts present in whole tissue extracts (Supplemental Fig. 3), LCM of arterial wall lymphocytes allowed identification of a more restricted pattern of expression. Several adventitial and plaque LCM samples that featured B cell related mRNAs also contained transcripts coding for the pro-inflammatory cytokines IL-6, GM-CSF and TNF- α (Fig. 6). Conversely, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , M-CSF, TGF- β , lymphotoxin A and lymphotoxin B mRNAs were never detected within microdissected cells (Fig. 6 and data not shown).

Discussion:

In atherosclerosis, lymphocyte infiltration in the adventitia has been known for a long time (35, 36) but description of its B cell component is more recent (7-13). Adoptive transfer experiments showed that vascular wall B lymphocytes constitutively home within arterial regions prone to lesion development (6, 7, 15, 28) indicating a high degree of specialization. However, many of the properties of these resident B cells remain to be described. Herein, we addressed the question of local Ig production for all H chain classes. Interestingly, adventitial IgA producing lymphocytes are an integral feature of the local immune response and are frequently associated to IgG expressing cells whereas IgM producing cells are often missing. IgA is definitely the dominant isotype produced by mammalian organisms but is mainly found in mucosal tissues; its presence in artery wall is more surprising. Whether IgA achieves, in this peculiar location, immune protection while avoiding deleterious inflammation and local tissue damage, as it does in the gut, remains to be determined. Both IgA1 and IgA2 are produced in arterial walls and distribution of $\alpha 1$ ($n = 10$) and $\alpha 2$ ($n = 2$) sequences in adventitia transcripts is close to that observed in blood where IgA1 represent the major (90%) IgA subclass (37). Arterial wall resident immune response associates production of IgG1 (the prototypic isotype of immune responses to T-dependent protein antigens (38)) and IgG2 (the major isotype elicited by T-independent polysaccharide antigens). These IgG subclasses also differ by their cytophilic properties. B cell maturation towards production of IgG1, IgG2 or IgA each involves different cytokine micro-environments requiring IL-4, IFN- γ and TGF- β respectively and genes encoding these cytokines were actively transcribed in the arterial walls under study (not shown).

Diversity of Ig expression within arterial wall has been evaluated only in human but was differently appreciated. Walton et al found a polyclonal BCR repertoire in 24/25 cases of abdominal aneurysms (10). On the other hand, Burioni et al demonstrated an oligoclonal expansion and evolution of local IgG1/ κ producing intimal lymphocytes interpreted as signs of antigen-driven maturation (39). Interestingly, VH3-23 or VH3-73 were the most represented VH genes in 4 out of the 6 intimal plaques examined in this latter study, but their CDR3 regions generated by the recombination process differed from those we found in adventitias. We show herein that low numbers of B cell clones populate the adventitial specimens. However, this conclusion needs to be balanced by taking in account the patchy nature of lymphocyte infiltration in arterial lesions. Moreover, since structure and inflammatory cell composition of diseased arterial wall may differ according to anatomic location (15), extrapolation of results to a whole organism has to be made with caution. Interestingly, the question of clonality of resident T cells in atherosclerotic lesions has also been addressed with contrasting results. Initial data pointed to a polyclonal origin for T cells in plaques (40, 41) but more recent studies demonstrated that resident T cells were locally activated and expanded and recognized oxLDL and heat shock protein (HSP) using a restricted TCR repertoire (42, 43).

BCR sequence analysis indicated that only a minority of adventitial B cells used germ-line VDJ regions and could therefore be classified as innate-like B1 or marginal zone (MZ) B lymphocytes. Accordingly, LCM isolated B cells did not feature the CD5 and CD27 markers present respectively on B1a and MZ sub-populations. By far, mutated VDJ sequences

identified a great proportion of resident B cells as fully differentiated B2 lymphocytes expressing switched isotypes. However most of these B cells were not yet committed towards a memory or plasma cell phenotype since they respectively lacked CD27 and BCL-6 or CD138 and Blimp-1 expression. The absence of CD20 expression by a majority of adventitial B cells may allow their classification as plasmablasts or early plasma cells (44).

Evidence of local differentiation of B lymphocytes gathered by the present study includes recurrent preferential utilization of certain VH genes, clonal diversification by additional somatic mutations, similarities in CDR sequences between independent B cells, clonal H chain switch and inversion of the λ/κ ratio of L chain utilization. AID that mediates somatic hypermutation and H chain class switch is, at a first glance, inconstantly present in arterial wall samples. However, this enzyme is normally expressed during limited steps of B cell differentiation and its detection in samples that are snapshots of long lasting lesions indicates that it likely plays a role in the natural history of the disease. Taken together, our results suggest the existence of an adaptive selection and it is tempting to speculate that resident adventitial B lymphocyte differentiation is an antigen-driven process. Indeed preliminary experiments in our laboratory with genetically engineered reconstructed adventitial antibodies indicate that they react with discrete components of arterial wall cell extracts.

B cells traffic regionally between adventitia and cervical lymph nodes. Despite limitations due to the human model (only a restricted portion of the arterial wall and a single lymph node can be examined per patient) and the low number of lymphocytes under study, clonally related B cells were easily found in different anatomic locations. It remains to be determined if B cells expressing isotypes other than IgA also circulate and if vascular wall lymphocytes can home in more distant lymphoid organs. In an individual arterial lesion, both CH and VH region expression differed between plaque and adventitia confirming the limited inflammatory cell traffic observed between these compartments in mouse atherosclerosis (15).

Animal models have shown that B lymphocytes impact on atherosclerosis physiopathology by different mechanisms. Natural anti-Ox-LDL IgM produced by B1a cells attenuate whereas B2 cells (directly or indirectly) promote atherosclerosis (5, 6, 26). However, adventitial B lymphocytes may be also early responders to atherogenic signals, limiting macrophage accumulation in intimal plaque through local production of anti-inflammatory cytokines (28). Results herein, obtained in a different context (advanced end stage lesions of aged patients), suggest different conclusions. Human arterial wall B cells produce GM-CSF which is known to be a regulator of lesional dendritic cell accumulation and differentiation (45). GM-CSF is one of the general determinants of macrophage polarization towards the pro-inflammatory M1 phenotype (46, 47) and is also clearly associated with IL-17-producing helper T cells (Th17 cells) pathogenicity (48). A correlation of Th17 cell frequencies with the extend and severity of carotid artery plaques has been established recently (49). Resident B cells produce IL-6 and TNF- α . Elevated serum levels of these cytokines are generally found in patients having poor prognosis or more severe arterial lesions (50, 51). Animal models aimed to decipher the role of IL-6, TNF- α and GM-CSF in atherosclerosis are far to be fully conclusive since experimental settings (feeding diet, location of the lesions and sex of the animals) largely determine the outcome of lesion evolution (52-59). In this study we show that IL-6, TNF- α and GM-CSF production is inconstant but characteristic of resident B cells whereas the lack of expression of the other tested cytokines is a permanent feature. Whether the observed differences also reflect discrete stages of arterial lesion evolution remains to be determined.

Indeed different cell types can synthesize these cytokines but IL-6 producing B cells were recently demonstrated to be major contributors to the pathogenesis of well-known T cell-mediated autoimmune conditions (60). Finally, the pattern of cytokine production by resident B cells described here does not fit well with the classification of effector B lymphocytes (61) in Be1 B cells (producing the pro-inflammatory Th1 type cytokines IFN- γ , IL-2 and IL-12) and Be2 B cells (producing the Th2 type cytokines IL-4, IL-6 and IL-10). Rather, resident B lymphocytes have an activated phenotype close to the one observed after in vitro B cell combined stimulation of the CD40 and BCR pathways (62).

Data herein are indeed compatible with B cells being a major component of the adventitial lymphocyte population within the severe carotid lesions of many patients, in agreement with the observations indicating that B cell parietal infiltration increases with progression of atherosclerosis (11, 15). The tertiary lymphoid tissue that develop in chronically rejecting heart allografts are predominantly B cell in origin or have compartmentalized B/T areas (63). AID and switched isotypes are expressed in the lymphoid structures within those grafted hearts. B lymphocytes also formed a prominent part of the inflammatory cells in renal transplants (64) or kidney diseases (65). A fundamental pathogenic role for B cells was demonstrated in human diseases such as type 2 diabetes or periodontal disease (66) and in obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance (67). Our results strongly suggest that B cells may be also important contributors in the physiopathology of human atherosclerosis.

Reduction of arterial lesion burden by anti-CD20 ablation of B lymphocytes in mouse atherosclerosis has raised the question of its possible use for disease management in human. Our data indicate that most resident B cells, that produce potentially deleterious cytokines, may not be suitable targets for global deletion protocols at end stages of the disease. However, modulating functional properties of arterial wall resident lymphocytes may still represent an interesting therapeutic option provided further understanding of B cell subset physiology was achieved, allowing selective therapeutic approaches.

Acknowledgments:

We thank Nathalie Bros from the Biothèque du CHU de Nîmes for excellent technical assistance.

Disclosures:

The authors have no financial conflict of interest.

References:

1. Weber, C., A. Zernecke, and P. Libby. 2008. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature Reviews Immunology* 8: 802-815.
2. Smith, J. D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, and M. Miyata. 1995. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage-colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein-E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8264-8268.
3. Hansson, G. K., and A. Hermansson. 2011. The immune system in atherosclerosis. *Nature Immunology* 12: 204-212.
4. Mallat, Z., S. Taleb, H. Ait-Oufella, and A. Tedgui. 2009. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* 50: S364-S369.
5. Ait-Oufella, H., O. Herbin, J.-D. Bouaziz, C. J. Binder, C. Uyttenhove, L. Laurans, S. Taleb, E. Van Vre, B. Esposito, J. Vilar, J. Sirvent, J. Van Snick, A. Tedgui, T. F. Tedder, and Z. Mallat. 2010. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *Journal of Experimental Medicine* 207: 1579-1587.
6. Kyaw, T., C. Tay, A. Khan, V. Dumouchel, A. Cao, K. To, M. Kehry, R. Dunn, A. Agrotis, P. Tipping, A. Bobik, and B.-H. Toh. 2010. Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *Journal of Immunology* 185: 4410-4419.
7. Galkina, E., A. Kadl, J. Sanders, D. Varughese, I. J. Sarembock, and K. Ley. 2006. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *Journal of Experimental Medicine* 203: 1273-1282.
8. Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers, and G. K. Hansson. 1986. Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth-muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 6: 131-138.
9. Munro, J. M., J. D. Vanderwalt, C. S. Munro, J. A. C. Chalmers, and E. L. Cox. 1987. An immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Human Pathology* 18: 375-380.
10. Walton, L. J., J. T. Powell, and D. V. Parums. 1997. Unrestricted usage of immunoglobulin heavy chain genes in B cells infiltrating the wall of atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis* 135: 65-71.
11. Houtkamp, M. A., O. J. de Boer, C. M. van der Loos, A. C. van der Wal, and A. E. Becker. 2001. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural organization suggests generation of local humoral immune responses. *Journal of Pathology* 193: 263-269.
12. Moos, M. P. W., N. John, R. Grabner, S. Nossmann, B. Gunther, D. Vollandt, C. D. Funk, B. Kaiser, and A. J. R. Habenicht. 2005. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 25: 2386-2391.
13. Watanabe, M., A. Sangawa, Y. Sasaki, M. Yamashita, M. Tanaka-Shintani, M. Shintaku, and Y. Ishikawa. 2007. Distribution of inflammatory cells in adventitia

- changed with advancing atherosclerosis of human coronary artery. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 14: 325-331.
14. Aubry, M. C., D. L. Riehle, W. D. Edwards, H. Maradit-Kremers, V. L. Roger, T. J. Sebo, and S. E. Gabriel. 2004. B-lymphocytes in plaque and adventitia of coronary arteries in two patients with rheumatoid arthritis and coronary atherosclerosis - Preliminary observations. *Cardiovascular Pathology* 13: 233-236.
 15. Graebner, R., K. Loetzer, S. Doepping, M. Hildner, D. Radke, M. Beer, R. Spanbroek, B. Lippert, C. A. Reardon, G. S. Getz, Y.-X. Fu, T. Hehlhans, R. E. Mebius, M. van der Wall, D. Kruspe, C. Englert, A. Lovas, D. Hu, G. J. Randolph, F. Weih, and A. J. R. Habenicht. 2009. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE(-/-) mice. *Journal of Experimental Medicine* 206: 233-248.
 16. Major, A. S., S. Fazio, and M. F. Linton. 2002. B-Lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 22: 1892-1898.
 17. Caligiuri, G., A. Nicoletti, B. Poirier, and G. K. Hansson. 2002. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *Journal of Clinical Investigation* 109: 745-753.
 18. Binder, C. J., K. Hartvigsen, M. K. Chang, M. Miller, D. Broide, W. Palinski, L. K. Curtiss, M. Corr, and J. L. Witztum. 2004. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 114: 427-437.
 19. Palinski, W., E. Miller, and J. L. Witztum. 1995. Immunization of low-density lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 821-825.
 20. Zhou, X. H., G. Caligiuri, A. Hamsten, A. K. Lefvert, and G. K. Hansson. 2001. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21: 108-114.
 21. Palinski, W., R. K. Tangirala, E. Miller, S. G. Young, and J. L. Witztum. 1995. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 15: 1569-1576.
 22. Cyrus, T., D. Pratico, L. Zhao, J. L. Witztum, D. J. Rader, J. Rokach, G. A. FitzGerald, and C. D. Funk. 2001. Absence of 12/15-lipoxygenase expression decreases lipid peroxidation and atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 103: 2277-2282.
 23. Tsimikas, S., W. Palinski, and J. L. Witztum. 2001. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 21: 95-100.
 24. Rossi, G. P., M. Cesari, R. De Toni, M. Zanchetta, G. Maiolino, L. Pedon, C. Ganzaroli, P. Maiolino, and A. C. Pessina. 2003. Antibodies to oxidized low-density lipoproteins and angiographically assessed coronary artery disease in white patients. *Circulation* 108: 2467-2472.

25. Tsimikas, S., E. S. Brilakis, R. J. Lennon, E. R. Miller, J. L. Witztum, J. P. McConnell, K. S. Kornman, and P. B. Berger. 2007. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *Journal of Lipid Research* 48: 425-433.
26. Kyaw, T., C. Tay, S. Krishnamurthi, P. Kanellakis, A. Agrotis, P. Tipping, A. Bobik, and B.-H. Toh. 2011. B1a B Lymphocytes Are Atheroprotective by Secreting Natural IgM That Increases IgM Deposits and Reduces Necrotic Cores in Atherosclerotic Lesions. *Circulation Research* 109: 830-U834.
27. Kyaw, T., P. Tipping, B.-H. Toh, and A. Bobik. 2011. Current understanding of the role of B cell subsets and intimal and adventitial B cells in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 22: 373-379.
28. Doran, A. C., M. J. Lipinski, S. N. Oldham, J. C. Garmey, K. A. Campbell, M. D. Skafien, A. Cutchins, D. J. Lee, D. K. Glover, K. A. Kelly, E. V. Galkina, K. Ley, J. L. Witztum, S. Tsimikas, T. P. Bender, and C. A. McNamara. 2012. B-Cell Aortic Homing and Atheroprotection Depend on Id3. *Circulation Research* 110: E1-U6.
29. Delfour, C., P. Roger, C. Bret, M. L. Berthe, P. Rochaix, N. Kalfa, P. Raynaud, F. Bibeau, T. Maudelonde, and N. Boulle. 2006. RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells. *Journal of Molecular Diagnostics* 8: 157-169.
30. Masir, N., M. Ghoddoosi, S. Mansor, F. Abdul-Rahman, C. S. Florence, N. A. Mohamed-Ismail, M.-R. Tamby, and N. H. Md-Latar. 2012. RCL2, a potential formalin substitute for tissue fixation in routine pathological specimens. *Histopathology* 60.
31. Lefranc, M.-P., V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Jabado-Michaloud, G. Folch, F. Bellahcene, Y. Wu, E. Gemrot, X. Brochet, J. Lane, L. Regnier, F. Ehrenmann, G. Lefranc, and P. Duroux. 2009. IMGT (R), the international ImMunoGeneTics information system (R). *Nucleic Acids Research* 37: D1006-D1012.
32. Glanville, J., W. Zhai, J. Berka, D. Telman, G. Huerta, G. R. Mehta, I. Ni, L. Mei, P. D. Sundar, G. M. R. Day, D. Cox, A. Rajpal, and J. Pons. 2009. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 20216-20221.
33. Zhou, X., and G. K. Hansson. 1999. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 50: 25-30.
34. Katsuda, S., H. C. Boyd, C. Fligner, R. Ross, and A. M. Gown. 1992. Human atherosclerosis .III. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young-adults. *American Journal of Pathology* 140: 907-914.
35. Gerlis, L. M. 1956. The significance of adventitial infiltrations in coronary atherosclerosis. *British Heart Journal* 18: 166-172.
36. Schwartz, C. J., and J. R. Mitchell. 1962. Cellular infiltration of human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation* 26: 73-&.
37. Kett, K., P. Brandtzaeg, J. Radl, and J. J. Haaijman. 1986. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory-tissues. *Journal of Immunology* 136: 3631-3635.

38. Stavnezer, J., and C. T. Amemiya. 2004. Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology* 16: 257-275.
39. Burioni, R., F. Canducci, D. Saita, M. Perotti, N. Mancini, D. De Marco, N. Clementi, A. Chieffo, M. Denaro, D. Cianflone, A. A. Manfredi, A. Colombo, A. Maseri, and M. Clementi. 2009. Antigen-Driven Evolution of B Lymphocytes in Coronary Atherosclerotic Plaques. *Journal of Immunology* 183: 2537-2544.
40. Stemme, S., L. Rymo, and G. K. Hansson. 1991. Polyclonal origin of lymphocytes-T in human atherosclerotic plaques. *Laboratory Investigation* 65: 654-660.
41. Swanson, S. J., A. Rosenzweig, J. G. Seidman, and P. Libby. 1994. Diversity of T-cell antigen receptor V beta gene utilization in advanced human atheroma. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 1210-1214.
42. Paulsson, G., X. H. Zhou, E. Tornquist, and G. K. Hansson. 2000. Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 20: 10-17.
43. Rossmann, A., B. Henderson, B. Heidecker, R. Seiler, G. Fraedrich, M. Singh, W. Parson, M. Keller, B. Grubeck-Loebenstien, and G. Wick. 2008. T-cells from advanced atherosclerotic lesions recognize hHSP60 and have a restricted T-cell receptor repertoire. *Experimental Gerontology* 43: 229-237.
44. Oracki, S. A., J. A. Walker, M. L. Hibbs, L. M. Corcoran, and D. M. Tarlinton. 2010. Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews* 237: 140-159.
45. Zhu, S.-N., M. Chen, J. Jongstra-Bilen, and M. I. Cybulsky. 2009. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *Journal of Experimental Medicine* 206: 2141-2149.
46. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2007. New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology* 37: 14-16.
47. Brocheriou, I., S. Maouche, H. Durand, V. Braunersreuther, G. Le Naour, A. Gratchev, F. Koskas, F. Mach, J. Kzhyshkowska, and E. Ninio. 2011. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 214: 316-324.
48. Peters, A., Y. Lee, and V. K. Kuchroo. 2011. The many faces of Th17 cells. *Current Opinion in Immunology* 23: 702-706.
49. Liu, Z., F. Lu, H. Pan, Y. Zhao, S. Wang, S. Sun, J. Li, X. Hu, and L. Wang. 2012. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication. *Atherosclerosis* 221: 232-241.
50. Harris, T. B., L. Ferrucci, R. P. Tracy, M. C. Corti, S. Wacholder, W. H. Ettinger, H. Heimovitz, H. J. Cohen, and R. Wallace. 1999. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *American Journal of Medicine* 106: 506-512.
51. Skoog, T., W. Dichtl, S. Boquist, C. Skoglund-Andersson, F. Karpe, R. Tang, M. G. Bond, U. de Faire, J. Nilsson, P. Eriksson, and A. Hamsten. 2002. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European Heart Journal* 23: 376-383.
52. Huber, S. A., P. Sakkinen, D. Conze, N. Hardin, and R. Tracy. 1999. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 19: 2364-2367.

53. Schieffer, B., T. Selle, A. Hilfiker, D. Hilfiker-Kleiner, K. Grote, U. J. F. Tietge, C. Trautwein, M. Luchtefeld, C. Schmittkamp, S. Heeneman, M. Daemen, and H. Drexler. 2004. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110: 3493-3500.
54. Ohta, H., H. Wada, T. Niwa, H. Kirii, N. Iwamoto, H. Fujii, K. Saito, K. Sekikawa, and M. Seishima. 2005. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 180: 11-17.
55. Schreyer, S. A., C. M. Vick, and R. C. LeBoeuf. 2002. Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *Journal of Biological Chemistry* 277: 12364-12368.
56. Schreyer, S. A., J. J. Peschon, and R. C. LeBoeuf. 1996. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *Journal of Biological Chemistry* 271: 26174-26178.
57. Shaposhnik, Z., X. Wang, M. Weinstein, B. J. Bennett, and A. J. Lusis. 2007. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor regulates dendritic cell content of atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 27: 621-627.
58. Ditiatkovski, M., B.-H. Toh, and A. Bobik. 2006. GM-CSF deficiency reduces macrophage PPAR-gamma expression and aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26: 2337-2344.
59. Haghghat, A., D. Weiss, M. K. Whalin, D. P. Cowan, and W. R. Taylor. 2007. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 115: 2049-2054.
60. Barr, T. A., P. Shen, S. Brown, V. Lampropoulou, T. Roch, S. Lawrie, B. Fan, R. A. O'Connor, S. M. Anderton, A. Bar-Or, S. Fillatreau, and D. Gray. 2012. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine* 209: 1001-1010.
61. Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain, and F. E. Lund. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology* 1: 475-482.
62. Burdin, N., C. Vankooten, L. Galibert, J. S. Abrams, J. Wijdenes, J. Banchereau, and F. Rousset. 1995. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B-lymphocytes. *Journal of Immunology* 154: 2533-2544.
63. Motallebzadeh, R., S. Rehakova, T. M. Conlon, T. S. Win, C. J. Callaghan, M. Goddard, E. M. Bolton, N. H. Ruddle, J. A. Bradley, and G. J. Pettigrew. 2012. Blocking lymphotoxin signaling abrogates the development of ectopic lymphoid tissue within cardiac allografts and inhibits effector antibody responses. *Faseb Journal* 26: 51-62.
64. Segerer, S., and D. Schlondorff. 2008. B cells and tertiary lymphoid organs in renal inflammation. *Kidney International* 73: 533-537.
65. Heller, F., M. T. Lindenmeyer, C. D. Cohen, U. Brandt, D. Draganovici, M. Fischereeder, M. Kretzler, H.-J. Anders, T. Sitter, I. Mosberger, D. Kerjaschki, H. Regele, D. Schloendorff, and S. Segerer. 2007. The contribution of B cells to renal interstitial inflammation. *American Journal of Pathology* 170: 457-468.

66. Nikolajczyk, B. S. 2010. B cells as under-appreciated mediators of non-auto-immune inflammatory disease. *Cytokine* 50: 234-242.
67. Winer, D. A., S. Winer, L. Shen, P. P. Wadia, J. Yantha, G. Paltser, H. Tsui, P. Wu, M. G. Davidson, M. N. Alonso, H. X. Leong, A. Glassford, M. Caimol, J. A. Kenkel, T. F. Tedder, T. McLaughlin, D. B. Miklos, H. M. Dosch, and E. G. Engleman. 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nature Medicine* 17: 610-U134.

Footnotes:

1: This work was supported by the regular dotation of Université Montpellier1 and CNRS to FRE 3400.

2: MH was supported by a doctoral fellowship from the Association Libanaise pour le Développement Scientifique.

3: CD was supported by a grant from the Fondation Lefoulon Delalande.

4: Abbreviations:

AID: Activation-induced cytidine deaminase

ApoE: Apolipoprotein E

B1: Innate-like B cells secreting natural antibodies

B2: Conventional B cells

BCL6: B-cell lymphoma 6

Be (1, 2): Effectors B cells

Blimp-1: B lymphocyte induced maturation protein 1

CEA: Carotid endarterectomy

Fc: Fragment crystallizable region

FR region : Framework region

HSP: Heat shock proteins

IMGT®: International ImMunoGeneTics information system ®

LCM: Laser-Capture Microdissection

LDL: low density lipoprotein

LDLR: low density lipoprotein receptor

M1: Classical inflammatory macrophages

MZ: Marginal Zone

N nucleotide: non template nucleotide

OxLDL: oxidized low density lipoprotein

P nucleotide: palindromic nucleotides

Treg: Regulatory T cells

Legend to Figures:

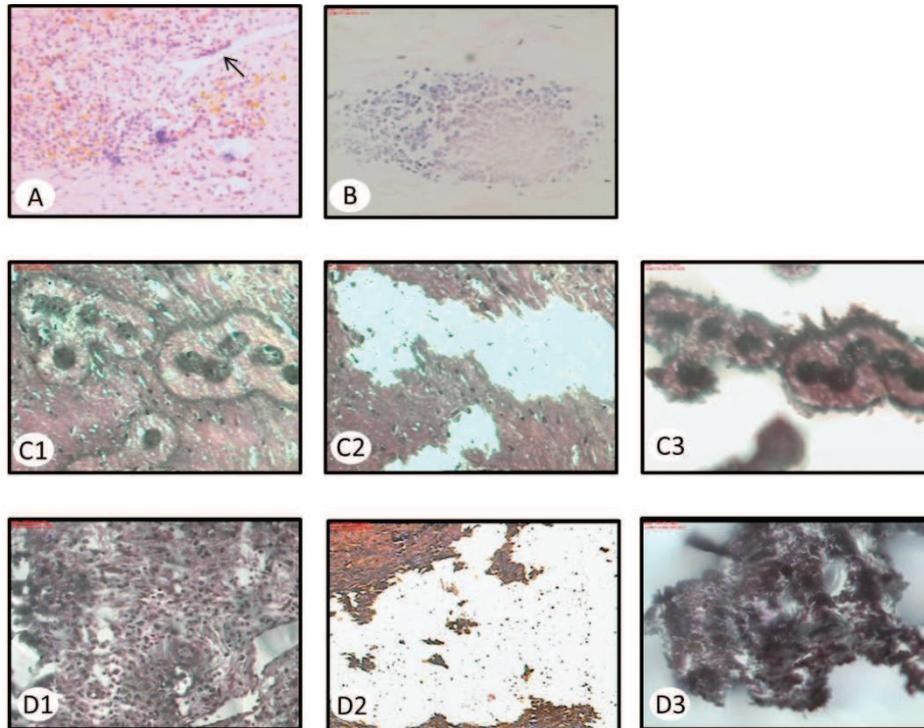


Figure 1: Morphology of arterial wall lymphoid infiltrates and Laser Capture Microdissection.

A: Diffuse lymphoid infiltrate in the vicinity of a vasa vasorum (arrow) in patient 15 adventitia. Magnification 100x.

B: Nodular lymphocyte aggregate in patient 16 adventitia. Magnification 200x.

C and D: Examples of LCM of patient 15 (C) and 14 (D) adventitial diffuse lymphoid infiltrates at different cell densities. Before (1) and after (2) laser shot; captured cells in cap (3).

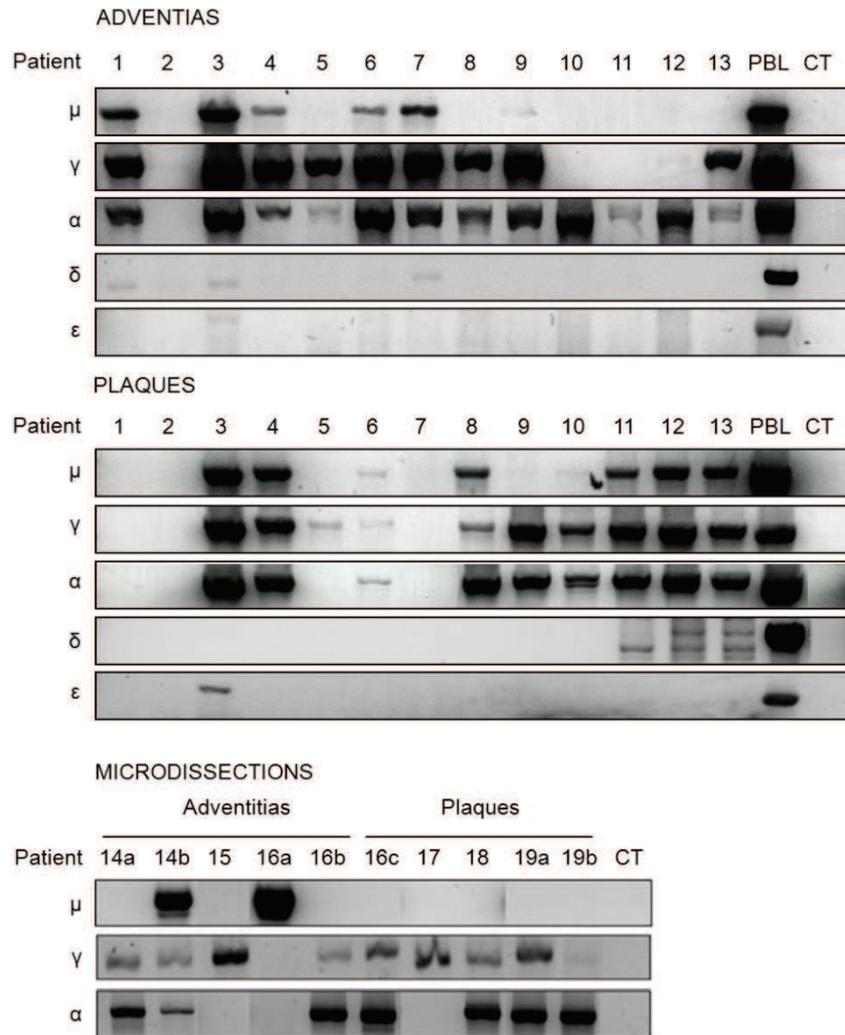
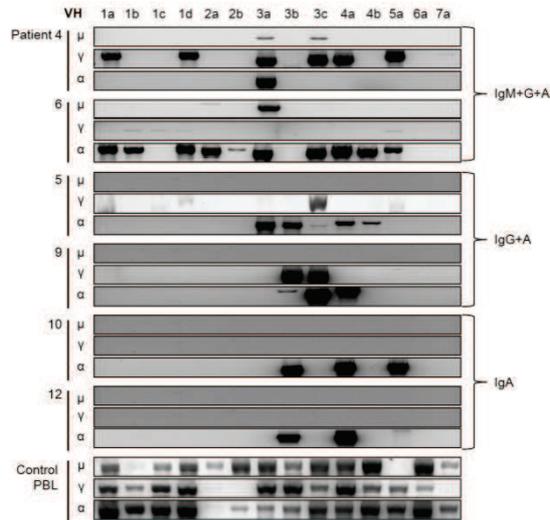


Figure 2: Expression of Ig H chain isotypes in atherosclerotic lesions.

Single round RT-PCR (32 cycles; adventitias and plaques) or nested RT-PCR (32 and 26 cycles; microdissections) using a forward JH primer with class-specific CH reverse primers. Microdissected cells in patient 16a and c samples were obtained from 2 independent adventitial and plaque nodular lymphocyte aggregates whereas all the other LCM specimens were representative of diffuse lymphoid infiltrates. Sequencing of patient 3 JH-CH ϵ PCR products identified amplification of sterile transcripts due to a cross-reaction between the JH primer and the germ line sequences. RNAs extracted from normal individual peripheral blood lymphocytes (PBL) or absence of RNA template (CT) are respectively used as positive and negative controls. The empty lane present on original gels between these 2 controls has been removed. Since samples were anonymized during this study, gel images corresponding to microdissections in Figure 2, 4B and 6 have been recomposed from original gel photographs to achieve coherent numbering of patient's specimens.

A



B

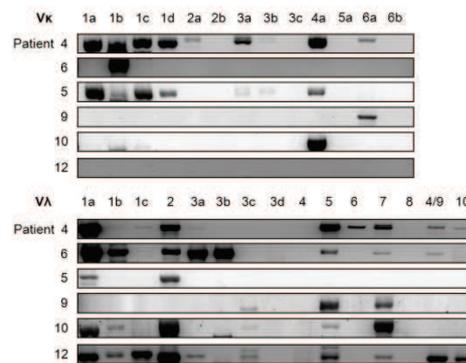


Figure 3: Adventitia samples each contain a limited number of B cell clones.

A: Nested RT-PCR (32 and 26 cycles) using forward VH family specific primers and reverse $C\mu$, $C\gamma$ and $C\alpha$ reverse primers. Templates are constituted by RNAs extracted from adventitias representative of the different IgH isotype distributions (2 in each group: IgM+IgG+IgA producers, IgG+IgA producers, IgA producers). The same analysis performed on RNAs extracted from normal individual peripheral blood lymphocytes (PBL) is given for comparison.

B: Single round RT-PCR (32 cycles) using forward $V\kappa$ or $V\lambda$ family specific primers and respective $C\kappa$ or $C\lambda$ reverse primers. Patients are analyzed in the same order as in Figure 3A.

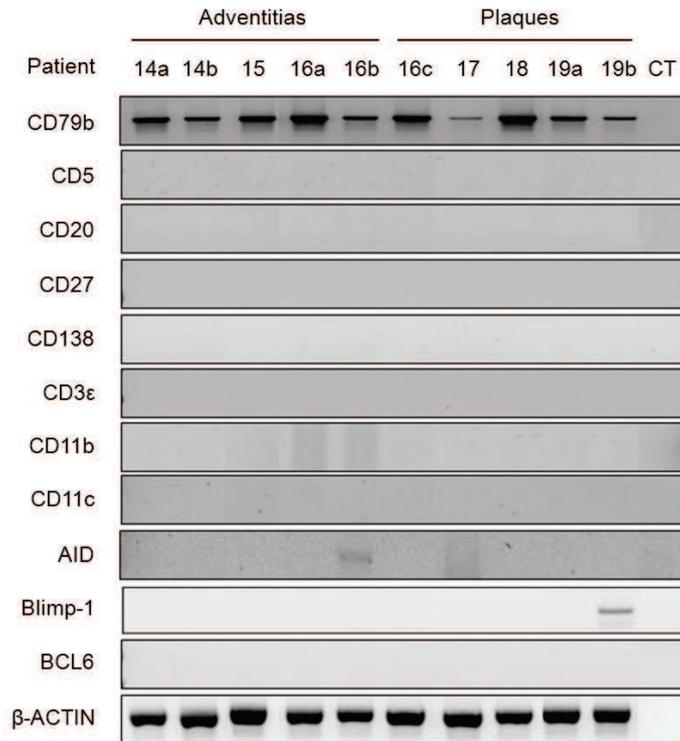


Figure 4: Markers of cellular differentiation in microdissected lymphoid cells.

Nested RT-PCR (32 and 26 cycles) performed on total RNAs obtained from microdissected lymphoid cells using specific primer pairs. Reactions resulting in undetectable amplification product were further amplified up to 50 cycles in the secondary rounds and remained negative (not shown). CT: control reaction in the absence of RNA template.

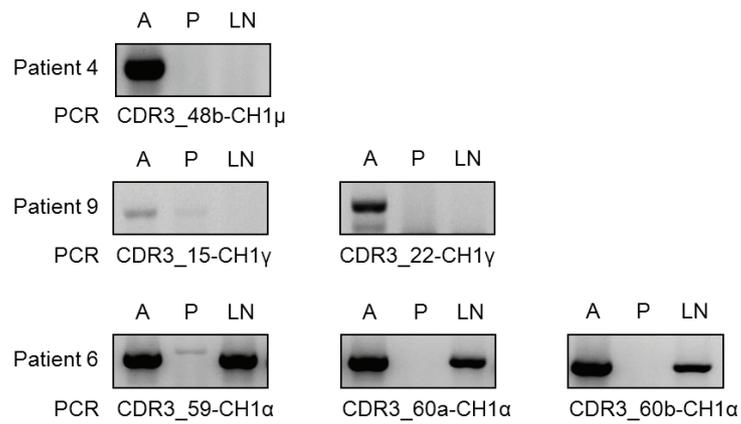


Figure 5: B lymphocyte traffic between adventitia and draining lymph nodes.

Single round RT-PCR (32 cycles) was performed on adventitia, plaque and available autologous draining lymph node using forward oligonucleotides specific of individual CDR3 sequences and reverse class-specific C_{μ} , C_{γ} or C_{α} primers. A: adventitia, P: plaque, LN: lymph node

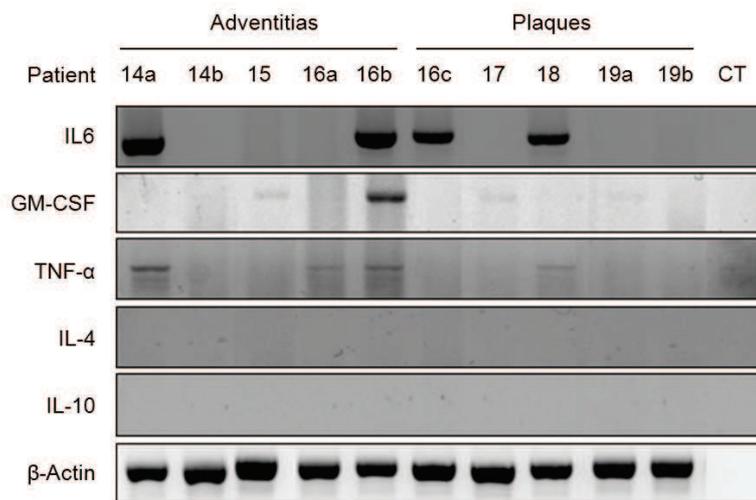


Figure 6: Arterial wall B lymphocytes preferentially express pro-inflammatory cytokines.

Nested RT-PCR (32 and 26 cycles) performed on total RNAs obtained from LCM arterial wall lymphoid cells using specific primer pairs. IL-4 and IL-10 PCRs are shown as representative negative results. CT: control reaction in the absence of RNA template.

Supplementary data

Figure S1: Primers used for PCR amplification

Figure S2: V, (D), J and C region usage in Ig H and L chain produced in representative adventitial samples.

The first two digits in sequence identification correspond to patient numbering. Identical VH region genes are identified in shades of grey. Numbers of mutations are given for cumulated FR1+2+3 regions and CDR 1+2 regions (H chains) or CDR 1+2+3 regions (L chains). Color code for CDR3 sequences: red: V region; green: N nucleotides; black: D region; blue: J region. Mutations in L chain sequences are in lower case letters. V, N, D and J nucleotides were identified using IMGT V-Quest software.

: nonfunctional transcript

Figure S3: Cytokine, differentiation marker, AID and transcription factor expression in patient's adventitias and plaques.

Nested RT-PCR (32 and 26 cycles) performed on whole tissue RNAs using cytokine (A), differentiation marker (B) and AID and transcription factor (C) specific primer pairs. CT: control reaction in the absence of RNA template. All PCRs were performed on the same day and with the same reaction mixtures used to amplify the corresponding transcripts in microdissected cells and thus also served as positive controls for the relevant experiments.

The β -actin positive control in panel C corresponds to single round PCRs (32 cycles).

Figure S4: Sequence analysis of Ig transcripts demonstrating local maturation of resident B cells.

In all sequences – indicates an identity. * indicates a gap.

A: Clonal H chain class switch in patient 9 adventitia. 09_23B and 09_15C cDNAs each contained a 100% identical VH3-72*01-DH3-9*01-JH5*02 sequence, associated respectively to a C γ 1 or a C γ 2 region. CDR and CH sequences are over lined. Sequence differences allowing γ H chain subclass identification are underlined. CDR and CH1 sequences are over lined in light and dark grey respectively.

B: Clonal diversification in patient 9 adventitia. The IgA1 mRNAs 09_66A and 09_88B featured a common CDR3 sequence resulting from a VH3-23*01-DH2-15*01-JH4*02 rearrangement whose formation has necessitated the incorporation of 13 N nucleotides (over lined in dark grey and underlined) and 2 mutations in the D region (over lined in light grey). However, 09_66A and 09_88B cDNAs had each accumulated independent mutations in FRs and CDR 1 and 2 regions (23 differences leading to 13 amino-acid replacements; over lined in light grey) that indicate a further somatic diversification of this B cell clone.

C: Shared CDR1 and 2 sequences between Ig α 1 transcripts of patient 9 (09_88B) and patient 4 (04_58A) using identical VH3-23 and JH4 sequences but different DH2-15 and DH3-10 regions respectively. CDRs are over lined. Somatic mutations in CDR2 09_88B sequence are under lined and in bold characters.

D: Common CDR3 sequence at the DNA level between patient 10 (10_61A) and patient 12 (12_75A) λ L chain transcripts. Somatic mutations compared to germ line sequences are over lined.

E: Creation of an identical Ig λ CDR3 protein sequence by independent IGLV2-8*01-IGLJ3*02 (cDNA 09_83A) and IGLV2-11*01-IGLJ3*02 (cDNA 12_76B) rearrangements and somatic mutations (over lined bases). N insertions are indicated in lower case letters. Sequences start at invariant 104 CYS codon (IMGT numbering).

F: Nucleotide sequence comparison of germ line (GL) VH3-23*04 gene and representative 06_60A family cDNAs in adventitia (Adv) and cervical lymph node (LN) of patient 6. CDR sequences are over lined. N nucleotides are in lowercase letters. Figures refer to IMGT codon numbering. CDR3 sequences of all cDNAs were identical. Since the clonotypic amplification oligonucleotide contributed the 20 last bases of the presented 142A and B sequences (4 N nucleotides and part of the JH3 exon), we amplified an overlapping CDR3-C α fragment which was shown to be fully homogenous by extensive cloning and sequencing.

Fig S1:

Primers for first round PCRs.

PCR	Forward primers (5'-3')	Reverse primers (5'-3')
β-actin	ACTACCTCATGAAGATCCTCA	CAGGAGGAGCAATGATCTTGA
CD3ϵ	CCTGGATCTGAAATACTATGGC	CCTTGTTTTGTCCCCTTTGC
CD5	TATGAGGCCAGGACAAGAC	AGTTGTCAGGCTGCATGGAG
CD11b	ATGGTGAGGACTCCTACAGG	ATCAGGAGGTGGTTATGCG
CD11c	AGACCACAAGCAGTAGCTCC	GAAGTTCAGACGCAAGGTAATG
CD20	CAGGGATCTATGCACCCATC	TGATCTTGGGGAGGTTCTGG
CD27	ACATGCAGACTCTGGCTGAC	CCGGTTTTCGGTAATCCTCC
CD79b	ATGGCCAGGCTGGCGTTGTC	CTCCTGGCCTGGGTGCTCAC
CD138	TGGGGATGACTCTGACAAC	CGTCCTTCTTCTTCATGCG
AID	AGGCGTGACAGTGCTACATCCTTT	AGCTGTCTGGAGAGACGAACTGAA
BCL-6	AGAGCCACTCACCCTCTAC	GGTAAGGTTTCTCTCCTGTGTG
Blimp1	ACATGACCGGCTACAAGAC	AGTTCCTTTCAGGTGAACC
GM-CSF	AGAGCCTGCTGCTCTTGGGC	CAGTCAAAGGGGATGACAAG
IL-1β	GCTCGCCAGTGAAATGATG	TGCTTGAGAGGTGCTGATG
IL-2	TCAACTCCTGCCACAATGTA	GTGAAACCATTTTAGAGCCCC
IL-4	TGTCACTGCAAATCGACACC	TCAGCTCGAACACTTTGAATAT
IL-6	AGGAGCCCAGCTATGAACTC	CAACATAAGTTCTGTGCCAG
IL-10	GCAAAAAGAAGGCATGCACAGCTC	GCCACCCTGATGTCTCAGTTT
IL-12	GCGCCTCGGGACAATTATAAA	GGACCTCGCTTTTTAGGAAGC
IFN-γ	GGCTTAATTCTCTCGGAAACG	GGCAGGACAACCATTACTGGGA
LT-α	ATGACACCACCTGAACGTC	GCCCTGGATACACCATCTTC
LT-β	GCCCCAGGATCAGGGAGGAC	AAGTCCACCATATCGGGGTGAC
M-CSF	TGTCGGAGTACTGTAGCCAC	TCTGGGACCCAATTAGTGCC
TGF-β1	TCAAGACCACCCACCTTCTG	GGTGTCTTAAATACAGCCCC
TNF-α	CCTCTTCTCCTTCTGATCGTG	ATCCCAAAGTAGACCTGCCAG
JH-CH1μ Rev	ACMMYGGTCACCGTCTCYTCAG	AGGAAGTCCTGTGCGAGGCAG
JH-CH1α Rev	ACMMYGGTCACCGTCTCYTCAG	GAACCTAAGAGCAGGTCCTCGA
JH-CH1γ Rev	ACMMYGGTCACCGTCTCYTCAG	TCCTTGGGTTTTGGGGGGAA
JH-CH1δ Rev	ACMMYGGTCACCGTCTCYTCAG	GGGTGGTACCCAGTTATCAAG
JH-CH1ϵ Rev	ACMMYGGTCACCGTCTCYTCAG	GTCGACCCAGTCTGTGGACGAT
VH1a-CH	CAGGTKCAGCTGGTGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH1b-CH	CAGGTCCAGCTTGTGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH1c-CH	SAGGTCCAGCTGGTACAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH1d-CH	CARATGCAGCTGGTGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH2a-CH	CAGATCACCTTGAAGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH2b-CH	CAGGTCACCTTGARGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH3a-CH	GARGTGCAGCTGGTGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev

VH3b-CH	CAGGTGCAGCTGGTGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH3c-CH	GAGGTGCAGCTGTTGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH4a-CH	CAGSTGCAGCTGCAGGAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH4b-CH	CAGGTGCAGCTACAGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH5a-CH	GARGTGCAGCTGGTGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH6a-CH	CAGGTACAGCTGCAGCAG	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
VH7a-CH	CAGGTSCAGCTGGTGCAA	CH2(γ,α)-CH1 μ Rev
Vκ1a-Cκ Rev	RACATCCAGATGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ1b-Cκ Rev	GMCATCCAGTTGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ1c-Cκ Rev	GCCATCCRGATGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ1d-Cκ Rev	GTCATCTGGATGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ2a-Cκ Rev	GATATTGTGATGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ2b-Cκ Rev	GATRTTGTGATGACTCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ3a-Cκ Rev	GAAATTGTGTTGACRCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ3b-Cκ Rev	GAAATAGTGATGACGCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ3c-Cκ Rev	GAAATTGTAATGACACAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ4a-Cκ Rev	GACATCGTGATGACCCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ5a-Cκ Rev	GAAACGACACTCACGCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ6a-Cκ Rev	GATGTTGTGATGACACAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vκ6b-Cκ Rev	GAAATTGTGCTGACTCAG	TGGAGGGCGTTATCCACCTTC
Vλ1a-Cλ Rev	CAGTCTGTGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ1b-Cλ Rev	CAGTCTGTGYTGACGCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ1c-Cλ Rev	CAGTCTGTCGTGACGCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ2-Cλ Rev	CAGTCTGCCCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ3a-Cλ Rev	TCCTATGWGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ3b-Cλ Rev	TCCTATGAGCTGACACAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ3c-Cλ Rev	TCTTCTGAGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ3d-Cλ Rev	TCCTATGAGCTGATGCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ4/9-Cλ Rev	CWGCCTGTGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ4-Cλ Rev	CAGCYTGTGCTGACTCAA	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ5-Cλ Rev	CAGSCTGTGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ6-Cλ Rev	AATTTTATGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ7-Cλ Rev	CAGRCTGTGGTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ8-Cλ Rev	CAGACTGTGGTGACCCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT
Vλ10-Cλ Rev	CAGGCAGGGCTGACTCAG	GCTCCCGGGTAGAAGTCACT

Primers for nested PCRs.

PCR	Forward primer (5'-3')	Reverse primer(5'-3')
β-Actin	TGGA CTTC GAGCAAGAGATG	AGGGCAGTGATCTCCTTCTG
CD3ε	AGGCAGTGATGAGGATCACC	TGGCCTTGGCCTTTTCTATTC
CD5	AGCAGCATCTGTGAAGGCAC	TCATTCCCCTGGGGCCAATC
CD11b	GCTTCCCTTGGAACAAACTG	GAAGCTCAGCCAGAAAGTC
CD11c	ATGGAGGATGAAGGCCGAAG	AGTGCCTGCCCAAATACTG
CD20	CATTGAGCCTCTTTGCTGC	GGAAGATGTTTCAGTTAGCCC
CD27	GGCAGCTGCCTGCCCGACT	GCTGTAACGACAAGGCTCT
CD79b	AAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCA	AATGTCCAGGCCCTCGTAGG
CD138	ATCCCACGTCTCCAGAAC	CCACTACAGCCGTATTCTCC
AID	TGGAATTGCTCTTCCCTCCGCTACA	AGCCCTTCCCAGGCTTTGAAAGTT
BCL6	ATGCAGAGATGTGCCTCCAC	ACGGGTGCCACAGATTTTAC
Blimp1	AAGACTTTCGGCCAGCTCTC	GCTTGTGCAGTTTCAGGTGC
GM-CSF	AGACACTGCTGCTGAGATG	TCCTTCAGGTTCTCTTTGAAAC
IL-1β	TACGAATCTCCGACCACCAC	CATCTTTCAACACGCAGGAC
IL-2	AGAATCCCAA ACTC ACCAGG	ACAATGGTTGCTGTCTCATCAG
IL-4	AGTTCTACAGCCACCATGAG	ATCGTCTTTAGCCTTTCCAAG
IL-6	AAGATTCCAAAGATGTAGCCG	CAAATCTGTTCTGGAGGTACTC
IL-10	TGTTGTTAAAGGAGTCCTTGC	TGGCTTTGTAGATGCCTTTC
IL-12	TTTTATGATGGCCCTGTGC	TGAAGAAGTATGCAGAGCTTG
INF-γ	AGCGGATAATGGA ACTCTTTTC	TGTATTGCTTTGCGTTGGAC
LT-α	ACCTGCTGCTCACCTCATTG	TGAGGAGAGGCACATGGAAG
LT-β	AGCCAGAAACAGATCTCAGCC	TGTTGACGTACACCCTCTC
M-CSF	GCGCTTCAGAGATAACACC	TCAGTTCCTCAGAGTCCTC
TGF-β1	CCATTCATGGCATGAACCG	AGCGCACGATCATGTTGGAC
TNF-α	ATCTTCTCGAACCCCGAGTGAC	AAGACCCCTCCAGATAGATGG
VH1 Nest-CH1	TCTGGRSCTGAGGTGAAGAAG	CH1(μ,γ,α)
VH2 Nest-CH1	CTGGTGAAACCCACASAGACC	CH1(μ,γ,α)
VH3 Nest-CH1	GACTCTCCTGTGCAGCCTCTG	CH1(μ,γ,α)
VH4 Nest-CH1	CAGGACTGKTGAAGCCTTCG	CH1(μ,γ,α)
VH5 Nest-CH1	TGGAGCAGAGGTGAAAAAGCC	CH1(μ,γ,α)
VH6 Nest-CH1	GGTCCAGGACTGGTGAAGCCC	CH1(μ,γ,α)
VH7 Nest-CH1	GGTCTGAGTTGAAGAAGCCTG	CH1(μ,γ,α)
VHn-CH1μ Nest	VH1 to VH7	CACGCTGCTCGTATCCGACGG
VHn-CH1α Nest	VH1 to VH7	GGCAGGGTCAGCTGGCTGCTC
VHn-CH1γ Nest	VH1 to VH7	AGGGCACGGTCACCACGCT

Forward primers used as clonotypic markers in PCR reactions:

04_CDR3_48b	5'-CAACTACGGTGACTACGTAG-3'
09_CDR3_15	5'-GGTCTATGGGACGATATGATGA -3'
09_CDR3_22	5'-ATATTTCTGTGTGAGAGATCCAT-3'
06_CDR3_59	5'-GAAGCCCGGGGAGTAAGCTTAA-3'
06_CDR3_60a	5'-CGGCTCACAGTGGGAGCAACTA-3'
06_CDR3_60b	5'-GAGCAACTAGAGCTACGGGGC-3'

Reverse primers used as clonotypic markers in PCR reactions:

06_59A_CDR3_rev	5'-CATGTAGTAGTAGAAGTAGA-3'
06_60A_CDR3_rev	5'-CTTGGCCCCAGATATCGCCC-3'

Reverse primers used for Ig subclass identification:

α 1 rev	5'-AGGGAGATGGGGTAGGTGGAG-3'
α 2 rev	5'-CAGCATGGGGGAGGTGGGGG-3'
γ 1 rev	5'-TGTGAGTTTTGTCACAAGATTTGGG-3'
γ 2 rev	5'-GGCACTCGACACAACATTTGC-3'
γ 3 rev	5'-TGTCACCAAGTGGGGTTTTGA-3'
γ 4 rev	5'-GCATGGGGGACCATATTTGGT-3'

Fig S2:

A:

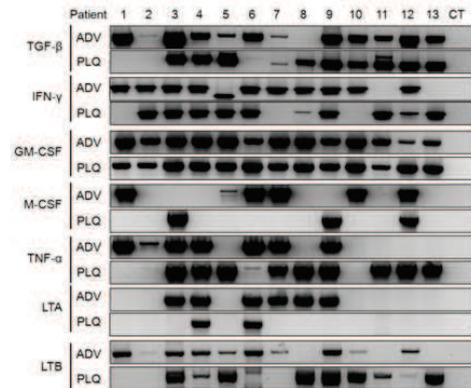
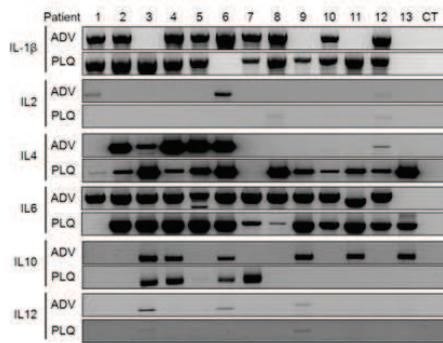
Sequence	VH	DH	JH	CH	FR mut.	CDR mut.	CDR3
04_58A	VH3-23*01	DH3-10*01	JH4*02	α 1	4	6	CCGAA--ACA--TCGGGAAG-TGG-----TTACT-TATT-----TTACT-TATT-----TT-GACTAC
06_59A	VH3-23*01	DH3-10*01	JH6*03	α 1	14	11	CCGA--GAA--GCCCGGG-AGTAAGCTTAACCTACTTCTACT-ACTAC---ATG-GACGTC
06_60A	VH3-23*01	DH1-26*01	JH3*02	α 1	14	5	CCGAG--AGA-CGGCTCACAG-TGGG-----AGCAA---CTAGA-GCTACG--GGGGGATATC
09_23A	VH3-23*01	DH3-10*01	JH4*02	γ 1	19	11	CCGAA--AGA-AGFTGGTCTT-TCGGG---AAATTTACTATTCTCCTTACTAC-----TTTGAATAC
09_66A	VH3-23*01	DH2-15*01	JH4*02	α 1	11	11	CCGAA--GCA--GTACGGGG-TGG-----TTC-----CTACT-ACTCCG--ATG-GACTAC
09_88B	VH3-23*01	DH2-15*01	JH4*02	α 1	5	7	CCGAA--GCA--GTACGGGG-TGG-----TTC-----CTACT-ACTCCG--ATG-GACTAC
05_02A	VH3-66*01	DH3-16*01	JH4*01	γ 1	15	10	CCGAG--AGAT-GCATTAGA-CGCTGGGG--CAGCCATGACTACT-----TTGACTAT
04_48A	VH3-66*02	DH4-17*01	JH5*02	μ	0	0	CCGAG--AGAT-CTCACTA-CGGTG-----ACTACG-----TAG-----
06_50A	VH3-66*02	DH2-21*01	JH3*02	μ	13	8	CCGAC--AAAT-TCAGGCG---GCTTCCT--TTCAAATTCAGTACTCTCTGATGCTTTTGAATC
09_23B	VH3-72*01	DH3-9*01	JH5*02	γ 1	17	19	CTTAGTCTATGGGACGATA-TGATGATTT-----GGTGGT-----TCGACCCC
09_15C	VH3-72*01	DH3-9*01	JH5*02	γ 2	17	19	CTTAGTCTATGGGACGATA-TGATGATTT-----GGTGGT-----TCGACCCC
04_49A	VH3-73*01	DH3-10*01	JH6*02	μ	0	0	ACTAGTTTGGGGCGGACTA-TGGTTCGGGGTTAT--TACTACT-ACTACGG-TATGGACGTC
04_57C	VH3-73*01	DH2-8*02	JH6*02	γ 1	4	4	ACTAG--AGATTAATACTGGTGTCTCTGGAATTT---GACTACT-TCTAGGG-TATGGACGTC
09_22A	VH3-30*03	DH3-3*02	JH3*02	γ 2	26	10	GTGAG--AGAT-CCATTTTG-GGG-----TGGT-----TTTGAATATT
12_41B	VH3-33*01	DH1-26*01	JH4*02	α 1	17	11	CCGAG--AGAT-GGGGGAG-TGGACCT---ACGGCATCTACT-----TTGACATT
10_45A	VH3-48*02	DH6-19*01	JH2*01	α 1	3	6	CCGAG--AGA-GGTCACTGCC-TGG-----TACT-----TCGATCTC
04_56B	VH3-49*03	DH6-19*01	JH4*02	γ 1	18	15	CTTAGAGCCAGTGGC-----TGGTSCCC---CTC--T-----TTGACCCAC
12_41A	VH3-64*05	DH6-13*01	JH4*02	α 1	20	15	ATGAA--AGCT-AGTGCCTA-TGACACCA-----GGTGTACTACTI-----TTGACCCAG
09_22B	VH3-7*01	DH4-17*01	JH5*01	γ 2	9	9	CCGAG--AAT-TGACTACGA-TGACACG-----GGAATTCAGTACTI-----
09_67A	VH4-39*01	DH6-19*01	JH6*02	α 2	11	13	CCGAGATCAAGGGTTTTC-CGGGGGTC-----CAACTACTI---ACCGCGGTATGGACGTC
10_46A	VH4-4*02	DH2-21*02	JH6*02	α 1	15	7	CCGAGA--AGGTG-----CGGTGGTAG-----TAACTGCA--CTTCGGTCTGGACGTC
12_43A	VH4-61*04	DH6-19*01	JH4*02	α 1	10	6	CCGAGA-----GTT-----CCCCCTA-----TAACTGAGT--GCTGGTACTTACTAC
10_47A	VH5-51*01	DH3-10*02	JH5*02	α 2	17	7	CCGAGGGACCATTTTTAGGTTTCGGGGAG-----AACTGGT-----TCGACCCC

B:

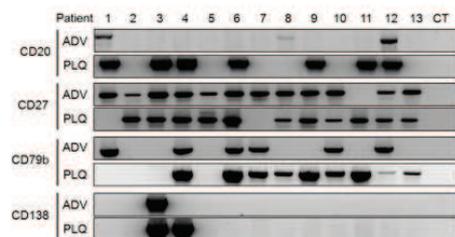
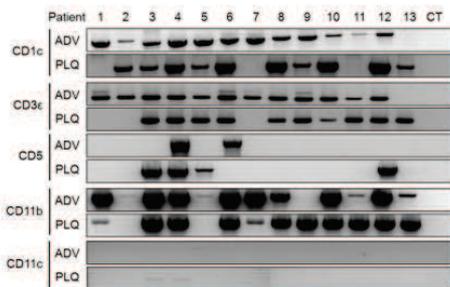
Sequence	V region	J region	Total FR mut.	Total CDR mut.	CDR3
05_7B	IGKV1-27*01	IGKJ4*01	6	1	CAAAAGTATA-ACAGTGCCTCCCTCAGT
05_7C	IGKV1-39*01	IGKJ2*01	6	6	CAACAGAGTT-ACA C TACGTATTACT t CT
05_9B	IGKV1-6*011	IGKJ4*01	12	9	t TACAAGATT-ACA g TT t CCCTCA T ACT
09_19D	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	8	8	t tCCAAGTACACACT-GGCTCGCAGG
09_19E	IGKV2-30*01	IGKJ1*01	9	8	t tCCAAGTACACACT-GGCTCGCAGG
10_65A	IGVK4-1*01	IGKJ3*01	8	7	CAGCA g TATT-ATAGT Cg TCCATTCACT
09_20B	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	10	3	GCAGCATGGGATGACAGCCTGA-----ATTG-----GGTGG
09_20E	IGLV1-44*01	IGLJ2*01	16	5	t CAGC g TGGGATGACAGCCTGA-----ATGGTC--CGGTTC
10_61A	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	3	3	GCAGCATGGGATGACAGCCTGA-----ATGG-----GGTGG
12_73B	IGLV1-44*01	IGLJ3*02	6	6	t CAGCATGGGATGACAGCCT g ----- g TGGTC--CGGTGG
10_61B	IGLV1-47*02	IGLJ3*02	4	4	GCAGCATGGGATGACAGCCTGA----- a TGG-----GGT g
12-75A	IGLV1-47*02	IGLJ3*02	2	4	GCAGCATGGGATGACAGCCTGA----- a TGG-----GGTGG
10_62A	IGLV2-11*01	IGLJ3*02	11	8	TGCTCATATGCCAGG ca CTACA----- a TTG-----GGTGG
12_76A	IGLV2-11*01	IGLJ3*02	4	6	T g tTCATA c GCAGGCAGCTACA-----CTTTG-----GGTGG
12_76B	IGLV2-11*01	IGLJ3*02	7	3	a g t TC g TATGCAGGCA CAAAA -----AATG-----GGTGG
05_12C	IGLV2-8*01	IGLJ1*01	1	8	AGCTCA ca TACA ca GCAG gg CA----- c TTA-----TGTTC
05_12D	IGLV2-8*01	IGLJ1*01	1	8	AGCTCATATGCAGCC ca -----A-----TGTTC
09_21c	IGLV7-46*01	IGLJ3*02	6	5	T-TGC-TCTTCCT-ATAGTGGT a ----- t TGC-----GGTGG
05_11A#	IGLV9-49*01	IGLJ3*02	1	0	GGGGCAGCATGGGAGTGGGAGCAACTCTCGTGGAGGGTG
05_11D#	IGLV9-49*01	IGLJ3*02	5	1	GGGGCAGCATGGTGTGGGAGCAACTCTCGT-----GAGTG

Fig S3:

A



B



C

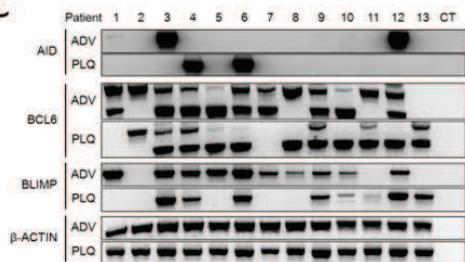


Fig S4:

A:

CDR 1

09_23B GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGGATCAGTAACCACTATATGGACTGGGTCCGCCAGGCTCCA
09_15C -----

CDR 2

09_23B GGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGATGTATTAGAGACAAAATAACGATTATCGCCCGGAGTATGCCGC
09_15C -----

09_23B GTCTGTGAAAGGCAGATTTATCATCTCAAGAGATGATTCAAGGAATTCGCTATTTCTAGAAATGAACA
09_15C -----

CDR 3

09_23B GCCTGAAAACCGACGACACGGCCATGTATTATGTGCTAGGTCTATGGGACGATATGATGATTGGTGG
09_15C -----

CH1 γ

09_23B TTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAGCGTCTCCTCTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT
09_15C -----

09_23B CCCCCTGGCAACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT
09_15C -----G--G--G-----C-A-A-----

09_23B ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACAC C γ 1
09_15C -----C-----T----- C γ 2

B:

```
--FR1-IMGT----->_____ CDR1-IMGT _____<-----  
09_88B GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT.....AGCAGCTATGCCATGAGC  
09_66A GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCCCTT.....AGGAATTATGGCATGAGT
```

```
----- FR2-IMGT ----->_____ CDR2-  
09_88B TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTCTAAGTGGTAGT.....  
09_66A TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTCTCATCTATAAAGTGGTAGT.....
```

```
-IMGT <-----  
09_88B .GGAGAGAGCACACACTACGCAGACTCCGTGAAG...GGCCGGTTCACCATCTCCCGAGACA  
09_66A .GGTGAAGCACATACTACGCTGGCTCCGTGAAG...GGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACA
```

```
----- FR3-IMGT -----  
09_88B ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGGGAGCCGAGGACACGGCCGTCTAT  
09_66A ATTCCAAGAAATACGCTGTATCTCAAATGAACAGCCTGGGAGCCGAGGACACGGCCGTCTAT
```

```
----->_____ CDR3-IMGT _____  
09_88B TACTGTGCGAAGCAGTACGGGGTGGTTCCTACTACTCCGATGGACTAC  
09_66A TACTGTGCGAAGCAGTACGGGGTGGTTCCTACTACTCCGATGGACTAC
```

C:

CDR1

09_88B GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA
04_58A -----

CDR2

09_88B GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTCTAAGTGGTAGTGGAGAGAGCACACACTACGCAGACTCCGT
04_58A -----

09_88B GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGG
04_58A -----A

CDR3

09_88B GAGCCGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAAGCAGTACGGGGTGGTTCCTACTACTCCGATGGAC
04_58A -----G-----A--TCGG-AA-----***-T----TATT-T---

09_88B TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
04_58A -----A-----

D:

```

<----- FR1-IMGT -----
10_61A IGLV1-44*01 CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCTCA***GCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGTCCAC
12_75A IGLV1-47*01 -----***-----

```

```

----->_____ CDR1-IMGT _____<-----
10_61A IGLV1-44*01 ATCTCTTGTTCGGAAGCAGCTTCAACATC*****GGAAGAATAACTGTAAAC
12_75A IGLV1-47*01 -----C--T-----G--T-----T--

```

```

----- FR2-IMGT ----->_____ CDR2
10_61A IGLV1-44*01 TGGTACCAGCAGATCCAGGAACGGCCCCAACTCCTCATCTATGGTAAT*****
12_75A IGLV1-47*01 -----C-----G-----*****

```

```

-IMGT _____<-----
10_61A IGLV1-44*01 *****AATCAGCGGACCTCAGGTGTCCT**GACCGATTCTCTGGCTCCAAG
12_75A IGLV1-47*01 *****-----C-----G-----***-----

```

```

----- FR3-IMGT -----
10_61A IGLV1-44*01 *****TCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCT
12_75A IGLV1-47*01 *****-----A--T-----

```

```

----->_____ CDR3-IMGT _____
GATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATGGGGTG 10_61A JL3*02
-----A--GGT----- 12_75A JL3*02

```

E:

```

09_83A          Vλ2-8*01          N    Jλ3*02

TGC AGT TCA TAT GCA GGC AAC AAG AAa TGG GTG TTC
Common CDR3    C  S  S  Y  A  G  N  K  K  W  V  F
--- A-T -G- --- --- --- -ac aaa aaa TGG GTG TTC

12_76B          Vλ2-11*01         N    Jλ3*02

```

F:

		23	CDR1	
VH3-23*04	(GL)	CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT		
06_60A	(Adv)	-----A-A-----C---		
06_142A	(LN)	-----G-A-----G---		
06_142B	(LN)	-----G-A-----G---		
		46	CDR2	60
VH3-23*04	(GL)	CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGT**GGTGGTAGCACATACTAC		
06_60A	(Adv)	G-----T-----C--C--C---C---CGT---CT-----TC--		
06_142A	(LN)	G-----T-----C--C--C---C---AGG---TT-----T---		
06_142B	(LN)	G-----T-----C--C--C---C---AGG---TT-----T---		
VH3-23*04	(GL)	GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTG		
06_60A	(Adv)	----A-----A-G-----		
06_142A	(LN)	----A-G-----A-----		
06_142B	(LN)	----A-G-----A-----		
		90	CDR3	
VH3-23*04	(GL)	CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGA/..		
06_60A	(Adv)	-----A-----T--C-T------G---cggctcac		
06_142A	(LN)	-----A-----T---T------G---cggctcac		
06_142B	(LN)	---C-----A-----C-----T---T------G---cggctcac		
D1-26*01	(GL)	AGTGGGAGCTACTA/..	.../GATATCTGGGGCCAAG	JH3*02 (GL)
06_60A	(Adv)	-----A---gagctacggggc-----		
06_142A	(LN)	-----A---gagctacggggc-----		
06_142B	(LN)	-----A---gagctacggggc-----		

CHAPITRE 4 :

IDENTIFICATION DES ANTIGENES

4 Chapitre 4 : Identification des antigènes

4.1 Introduction

L'athérosclérose implique une inflammation systémique et locale [59]. Le taux sérique des auto-Ac (anti-HSP, anti LDLox) est un des marqueurs pronostiques de l'inflammation systémique et du risque de la maladie mais ne reflète pas la composante locale [622].

Au niveau tissulaire, les cellules immunitaires s'organisent en VALT qui est impliqué dans la protection et la surveillance locale des antigènes (endogènes et exogènes) [169-171].

Le traitement actuel de l'athérosclérose est fondé sur la réduction des lipides combinée à une thérapie anti-inflammatoire. Bien que ces approches ralentissent la progression de la maladie (30-40%), elles sont incapables d'inhiber complètement la formation des plaques [623].

La caractérisation du rôle majeur du système immunitaire dans le développement des lésions vasculaires nous aide à concevoir des traitements immunologiques efficaces contre l'athérosclérose. Ces études immunologiques sont toujours à la recherche des nouvelles cibles dans le but de prévenir les maladies cardiovasculaires. Il est important et urgent de trouver d'autres traitements ciblant directement la paroi artérielle [12] car l'artérite se déclenche avant la réponse systémique [56, 59]. La modulation de l'immunité locale semble être une approche prometteuse [12, 623]. Ces interventions nécessitent la détermination et l'identification des antigènes locaux à cibler [59].

L'athérosclérose est une maladie multifactorielle dont la cause principale reste inconnue [624]. La majorité des antigènes potentiels d'athérosclérose est constituée des PAMP et/ou DAMP communs entre plusieurs maladies et infections [265]. Il serait essentiel et indispensable d'identifier un antigène spécifique de l'athérosclérose [622, 623].

Des LT isolés de la plaque montrent une réactivité contre les LDLox [210] et les HSP [625]. Ces 2 types d'antigènes stimulent une réponse systémique ainsi qu'une inflammation locale dans l'intima. Par contre, on ne connaît pas vraiment les antigènes de l'adventice à l'origine d'une réponse tissulaire [12, 622].

La domiciliation des cellules B adventitielles est due pour partie aux signaux fournis par le BCR. Ces lymphocytes B résidents contribuent à la réponse humorale locale en sécrétant des anticorps IgM, IgG [177, 182] et IgA (article 1). Nos résultats du chapitre 3 (article 1) montrent une domiciliation sélective ainsi qu'une maturation locale d'un nombre limité de clones de LB adventitiels. Ces derniers se différencient sous la pression sélective des antigènes locaux qui permettent le recrutement, d'une façon récurrente, de cellules avec un BCR spécifique.

La restriction du répertoire des lymphocytes B suggère également la contribution d'un nombre limité d'antigènes comme cibles de la réponse adventitielle. De manière intéressante, le répertoire des LB de l'adventice est différent de celui des cellules B de la plaque laissant ainsi supposer que les antigènes reconnus dans les 2 couches sont différents. Ces résultats nous encouragent et nous incitent à explorer les antigènes adventitiels. A cette fin, nous avons développé quelques Ac pour les utiliser ultérieurement comme outils expérimentaux spécifiques. Pourtant, ces Ac pourraient avoir également des retombées dans les domaines diagnostiques ou thérapeutiques.

4.2 Choix méthodologique

Les Ac sont utilisés dans des domaines variés tels que le diagnostic, l'imagerie et la thérapeutique [626]. De plus, les Ac monoclonaux constituent la classe de protéines

thérapeutiques se développant actuellement le plus rapidement. Leurs domaines d'application et d'utilisation sont extrêmement larges et diversifiés : cancers, infections, maladies cardiovasculaires, maladies auto-immunes.

La méthode que nous avons utilisée est la plus conventionnelle pour construire des Ac. Elle nécessite l'isolement de l'ADN codant pour les domaines VH et VL des Ac exprimés chez les patients. Ces fragments sont ensuite liés à l'ADN codant les domaines constants H (MoG2A) et L murins (MoC λ). La production d'Ac consiste aussi à faire exprimer de façon stable, dans des lignées lymphocytaires B, les gènes réarrangés des chaînes (H+L) isolés à partir des patients. Notre approche permet de disposer de molécules entières d'Ig et de tester plusieurs combinaisons possibles (H+L). Les constructions ont été introduites dans les cellules myéломateuses de souris NS0 ne sécrétant pas d'Ig (Sp2/0-Ag14) [627, 628].

Le système d'expression choisi joue un rôle important dans la qualité de la protéine produite. Bien qu'il ait plusieurs systèmes capables de produire des Ac recombinants (champignons, bactéries, levures), les cellules de mammifères sont souvent le meilleur choix et le système le plus adapté pour produire un Ac car elles permettent un repliement fonctionnel et des modifications post-traductionnelles semblables à celles de l'homme. Les systèmes bactériens se révèlent supérieurs pour la production de fragments [629, 630]. Les systèmes eucaryotes permettent également la formation de ponts disulfures, le clivage protéolytique et la sécrétion des protéines solubles [631]. Ces modifications (surtout les glycosylations) sont impliquées dans la formation des sites d'interaction de la partie Fc avec ses différents partenaires (complément, FcR) [631, 632]. Par contre, l'effet de la glycosylation sur la fixation à l'antigène n'a pas encore été démontré [633, 634]. Il faut noter que ces changements post-traductionnels dépendent du type des cellules receveuses et des conditions de culture [631, 633-636]. Bien que des variations de profil de glycosylation entre les différentes cellules de mammifère soient observées (CHO et NS0), il n'y a pas encore de preuves cliniques qu'elles modulent l'activité des Ac *In vivo* [637]. D'autre part, ces cellules présentent quelques désavantages tels que le coût élevé de leur culture, leur croissance lente et le grand risque et susceptibilité de contamination par les microorganismes. La productivité des clones peut décroître au fur et à mesure de la culture, par la perte des gènes codants pour l'Ac [638].

Les lignées mammifères les plus utilisées peuvent être d'origine murine (NS0), humaine (HEK293 : Human Embryonic Kidney) ou d'autres espèces (Hamster(CHO), rat). Quoique toutes les cellules mammifères puissent sécréter des Acs, il y a des lignées qui sont plus adaptées. Le repliement et l'assemblage ainsi que la sécrétion peuvent être des étapes limitantes de la production d'Ac. Les protéines impliquées dans ces fonctions sont exprimées différemment entre les différentes cellules de mammifère. NS0 est un plasmocytome de souris sans gène productif d'Ig qui possède toute la machinerie nécessaire pour sécréter les Ac. Le choix de NS0 s'est basé sur les caractéristiques de cette lignée. Ces cellules se multiplient indéfiniment en donnant naissance à des populations de cellules filles identiques entre elles. D'autre part, chaque clone de cellules filles produit un même Ac. De plus, elles peuvent être gardées pendant des années en culture *in vitro* ou congelées, sans modification de l'Ac qu'elles produisent. Ainsi, NS0 est une source illimitée de cellules produisant toujours le même Ac avec la même affinité et les mêmes propriétés.

Ces cellules étaient cultivées dans le milieu DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) supplémenté par de la L-glutamine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Un

mélange d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) a été ajouté au milieu à la concentration de 100 µg/ml. La culture était maintenue à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂.

4.3 Matériels et méthodes

4.3.1 PCR

La PCR, technique de base de la construction de l'Ac, a permis d'amplifier les fragments cibles des chaînes fonctionnelles murines et humaines. Des oligonucléotides spécifiques ont été conçus pour amplifier les fragments d'intérêt nécessaires à la construction ou pour contrôler l'orientation des ligations. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant 1 à 100 ng d'ADN matrice, 25 pmoles de chaque amorce, 400 µM de chaque dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 5 µl de tampon PCR 10X et 2.5 U de Taq ADN polymérase. Les réactions de PCR consistent en une étape de dénaturation pendant 10 min à 94°C suivie de n cycles d'amplification. Chaque cycle est constitué d'une succession d'étapes : dénaturation à 94°C pendant 45 s, hybridation à 55°C pendant 30 s et polymérisation à 70°C pendant 1 min 30 s. Une étape d'élongation finale à 72°C termine la PCR pour assurer l'homogénéité des produits. La réaction est menée, durant 26 à 32 cycles, dans un appareil automatisé.

Tampon PCR 10x : 200 mM Tris-HCl PH 8,4, KCl 500mM

4.3.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les réactions de PCR ainsi que les produits de digestion ont été analysés sur des gels d'agarose. Ces molécules d'ADN sont séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique dans un tampon TBE 1x (Tris-Borate-EDTA). L'agarose a été préparée à partir d'agarose ultra-pure (sans RNase et DNase) avec des concentrations (0,8 %-2%) variant en fonction de la taille de la bande à identifier. La bande d'intérêt a été isolée et purifiée en utilisant des kits Qiagen selon les instructions fournies par le fabricant.

TBE (1X) : 89 mM Tris, 89 mM acide borique, 2 mM EDTA Na₂.

4.3.3 Purification des fragments d'ADN issus de gels d'agarose

Après fractionnement sur gel d'agarose, le fragment d'ADN d'intérêt est découpé sous lumière UV. L'ADN est ensuite récupéré par simple filtration 5 min à 5000 g sur colonne ultra-pure (QIAGEN). La bande d'agarose est dissoute dans le tampon QG, passée sur la colonne et lavée avec du tampon PE. Enfin, l'ADN est élué par 50 µl d'eau ultrapure.

4.3.4 Clonage d'un produit de PCR

Le Kit TOPO II-TA cloning® Invitrogen permet le clonage efficace et rapide d'un produit obtenu par PCR dans un plasmide vecteur. Ce système ne nécessite aucune ligase et aucune étape supplémentaire après l'étape de PCR. Le vecteur linéaire PCR® II-TOPO® possède un résidu (dT) 3' cohésif qui s'hybride avec le désoxy-adénosine (dA) ajouté à l'extrémité 3' des produits PCR. En plus, le mélange réactionnel contient de la topo-isomérase I qui permet d'assembler le produit de PCR avec le vecteur. Le produit de la ligation est directement utilisé pour transformer les bactéries compétentes.

Protocole:

Le produit de la réaction de PCR (4,5 µl) est incubé 5 min à température ambiante avec 0,5 µl de vecteur PCR®II-TOPO® et 1 µl de la solution saline (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl₂). 2 µl du milieu réactionnel est ensuite ajouté à un tube de bactéries compétentes (60µl) Oneshot®TOP 10, et laissée 30 min sur la glace. Ensuite un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube 1 min à 42°C puis 5 min dans la glace. Après une incubation d'une heure (1h) à 37°C dans du milieu S.O.C permettant l'expression du gène de résistance codé par le vecteur, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Pétri LB-Agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Pour utiliser le système de criblage bleu/blanc, 50µl de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) à 50 mg/ml (Cf = 0.17 mg/ml) sont aussi ajoutées et étalées sur les boîtes de Pétri. Les colonies contenant un plasmide recombinant sont blanches.

Milieu SOC : 2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose

Milieu LB : extrait de levure 5g/l, bactrotryptone 10g/l, NaCl 10g/l, pH 7,0

Milieu LB-agar : milieu LB additionné de 1,5 % d'agar (Poids/Volume : P/V).

milieu SOC : 2% tryptone, 0,5% yeast extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glucose.

4.3.5 Ligation

L'assemblage des fragments d'ADN des chaînes chimères a été fait à l'aide de la T4 DNA ligase. Ces ligations ont été précédées par une étape de déphosphorylation du vecteur pour empêcher l'auto-ligation. Comme la température adéquate de la réaction de ligation varie en fonction des réactifs, le milieu réactionnel est placé toute la nuit dans un seau de glace laissé à température ambiante. Ainsi l'augmentation croissante de la température permet d'atteindre les conditions optimales de ligation. Un aliquot de la réaction de ligation est ensuite transfecté dans les bactéries compétentes.

Le milieu réactionnel de 20 µl contient :

- 10 à 20 ng de vecteur.
- le fragment d'ADN, dans un rapport molaire insert/vecteur compris entre 2 et 3.
- 4 ul de tampon de ligation 5x. - 1U de T4 ADN ligase.

Tampon de ligation 5x :

Tris-HCl PH 7,6 250 mM, MgCl₂ 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5mM, PEG 25 % (P/V).

4.3.6 Préparation de l'ADN plasmidique

L'ADN de plasmide a été isolé, selon la quantité désirée, à partir de mini ou de midi-préparations. Les termes mini et midi désignent le volume de départ de la culture bactérienne. L'extraction nécessite une lyse alcaline des bactéries [639], suivie d'une étape de purification sur colonne. Les préparations en petit volume (minipreps) utilisées souvent pour la sélection des clones, sont préparées à partir de 2 ml de culture bactérienne. Le protocole expérimental fourni avec le kit Promega®plasmid a été suivi pour les Minipreps.

Pour les quantités plus importantes d'ADN, les plasmides ont été isolés à partir de 100 à 200 ml de culture bactérienne à l'aide du plasmid Midi Kit QIAGEN®. Toutes les étapes de purification sont réalisées dans les conditions préconisées par le fabricant. Une étape supplémentaire de stérilisation à l'éther était accomplie juste avant la transfection.

4.3.7 Extraction d'ADN génomique

Cette extraction nécessite une lyse des cellules ou des tissus par des détergents (SDS 1% - Sodium Dodécyl Sulfate), qui vont dégrader les membranes et les protéines, en particulier celles associées à l'ADN dans la chromatine. L'addition d'EDTA (0.05M) et de protéinase K (100µg/ml) améliore l'efficacité de l'extraction. (La protéinase K permet de libérer l'ADN nucléaire en digérant les histones qui lui sont associées dans le chromosome). La solution obtenue est en général très visqueuse car l'ADN ainsi libéré forme de très longs filaments.

L'étape suivante est la déprotéinisation de la solution qui se fait par une extraction en utilisant un mélange de solvants phénol/chloroforme. Les protéines dénaturées forment un précipité à l'interface phénol-eau, tandis que l'ADN reste en solution dans la phase aqueuse et surnage à la surface de la solution. On récupère uniquement la phase supérieure qui est ensuite précipitée par 2 volumes d'éthanol absolu en présence de NaCl (0,5 M). Le culot est ensuite lavé plusieurs fois dans de l'éthanol à 70 % et resuspendu dans 100 µl d'eau.

4.3.8 Quantification de l'ADN et de l'ARN

Le dosage des acides nucléiques a été réalisé par spectrophotométrie. L'absorbance de la solution est mesurée à 260 nm et à 280 nm (A_{260} et A_{280}) pour un trajet optique de 1 cm. Le rapport A_{260}/A_{280} nous renseigne sur la pureté de la solution (il doit être compris entre 1,7 et 2). Les concentrations sont ensuite calculées en utilisant les coefficients d'extinction molaire $6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ respectivement pour l'ADN double brin et l'ARN.

4.3.9 Analyse des séquences

Le séquençage d'ADN a été réalisé par la société MWG. Les plasmides ont été préparés à la concentration décrite. Les vecteurs PCR®II-TOPO® ont été séquencés en utilisant les promoteurs universels T7 ou M13. Cependant les constructions finales dans les vecteurs PSV7-néo ont été séquencées en utilisant différentes amorces spécifiques des fragments constituant la chaîne afin de disposer de la totalité de la séquence. L'analyse des séquences a été accomplie sur le site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI) tandis que l'identification des FR et CDR a été faite par l'outil en ligne IMGT/V-QUEST.

4.3.10 Digestion par des enzymes de restriction

La digestion a surtout été utilisée pour contrôler la présence d'insert dans le plasmide. Le vecteur PCR®II-TOPO® contient des sites EcoRI aux 2 extrémités de la région d'insertion, permettant ainsi d'identifier les clones d'intérêt.

Par contre, l'organisation du vecteur PSV7-néo est différente. Des enzymes compatibles sélectionnées selon chaque séquence, permettent de contrôler la présence et l'orientation d'insert. 5 µl d'ADN purifié ont été digérés dans un volume total de 20 µl à 37 °C pendant 1h 30 min et analysés sur un gel d'agarose.

4.3.11 Transfection Cellulaire

L'électroporation est une technique qui permet d'introduire l'ADN dans une cellule. Cette technique est à la fois très efficace et très simple à mettre en œuvre. Les cellules sont d'abord cultivées en milieu complet (DMEM + 10 SVF + L-Glutamine + antibiotiques), puis centrifugées et resuspendues dans 50µl de ce milieu. L'ADN est ensuite ajouté et les cellules en suspension sont transférées dans une cuvette d'électroporation. Un choc électrique (180 V, 99 µs) rend l'enveloppe cellulaire perméable et permet l'entrée de l'ADN.

Après 2 jours d'incubation (milieu complet), les cellules sont cultivées dans un milieu sélectif contenant du Généticine (G418-SIGMA) à 0.5 mg/ml.

4.3.12 Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (PAGE)

La migration sur gel de polyacrylamide est utilisée pour la séparation des protéines. Le gel comporte deux parties : un gel de concentration et un gel de séparation.

Il est préparé à partir d'une solution d'acrylamide N, N' méthylène bis-acrylamide (19/1) de 15 % dans du tampon Tris-HCl. Les mailles de la matrice sont définies par le rapport polyacrylamide / N, N' méthylène bisacrylamide. La porosité du gel d'acrylamide (5 à 12 %) varie selon la taille des protéines à fractionner. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition de persulfate d'ammonium [APS : 0,1% (P/V)] et de TEMED [Tetraméthyléthylènediamine : (0,035% (V/V))].

Avant de les charger sur un gel d'acrylamide, les échantillons sont préparés en mettant une quantité égale de lysat cellulaire et de tampon de charge 2x (en condition réductrice ou non). Les échantillons sont ensuite bouillis 5 minutes avant d'être déposés (15 à 20 µl) sur un gel SDS-PAGE. Le marqueur de poids moléculaire des protéines seeBlue® sert de référence. La migration s'effectue à 100 V dans le tampon de migration.

Gel de concentration : Acrylamide 5 %, Tris-HCl PH 6.8 100 mM, SDS 0.1% (P/V).

Gel de séparation : Acrylamide, Tris-HCl, PH 8.8 100 mM, SDS 0.1 % (P/V).

Tampon de charge : 0,5M Tris-HCl pH 6,8, 20% glycérol, 10% SDS, 0,1% bleu de bromophénol avec ou sans 5% β-mercaptoéthanol.

Tampon de migration : Tris 50 mM - Glycine 0,2 M - SDS 0,1% - pH 8,3 - 8,8.

4.3.12.1 Coloration

Une fois la migration terminée, le gel est fixé et coloré au bleu de Coomassie pendant une heure dans une solution de coloration sous agitation lente constante, puis décoloré par plusieurs passages dans une solution de décoloration.

Solution de coloration : acide acétique 10% (v/v) ; éthanol 25 % (v/v) ; bleu de coomassie 0.25% (p/v).

Solution de décoloration : acide acétique 10% (V/V), éthanol 20 % (V/V).

4.3.13 Immuno-révélation de type Western blot

Cette technique consiste à révéler une protéine à l'aide d'Ac spécifiquement dirigés contre cette protéine. Elle nécessite la fixation des protéines sur une membrane.

Les protéines ont été d'abord séparées sur un gel 12 % d'acrylamide puis transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm. L'ensemble est disposé en sandwich entre 6 feuilles de papier Whatman imbibées avec du tampon de transfert dans une cuve à électro-transfert semi-

sec. Le gel et la membrane sont placés de sorte que les protéines se fixent sur la membrane en migrant de la cathode vers l'anode. Ce transfert est effectué à 0,8 mA par cm² de membrane pendant 1h. La membrane est saturée et les sites aspécifiques de fixation sont bloquées par incubation, pendant 1 heure sous agitation, dans du tampon bloquant (PBS - 0.1% Tween - 5% lait). L'Ac primaire spécifique est ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé une nuit à 4 °C (ou 1h à 2h à température ambiante) sous agitation. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min (PBS-Tween 0,1%) puis immergée dans un tampon de saturation contenant l'Ac secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (MILLIPORE). L'ensemble est agité une heure à température ambiante, puis lavé 3 fois 10 min avant révélation.

Tampon de transfert : 25 mM Tris, 192 mM glycine, 10% méthanol.

Tampon de saturation : PBS-Tween 0.1%, 5% lait.

Tampon de lavage : PBS-Tween 0.1 %.

4.3.13.1 Révélation

On utilise une révélation par kit ECL (Enhanced Chemical Luminescence) (MILLIPORE) qui consiste en une réaction de chimiluminescence catalysée par la peroxydase. Dans la pratique, les conditions préconisées par le fournisseur sont suivies. La membrane ayant fixé l'Ac secondaire, est ensuite incubée avec le substrat pendant 5 min et l'émission lumineuse est révélée par autoradiographie.

4.3.14 Purification

Cette méthode se fonde sur la spécificité et l'affinité d'interaction entre la partie Fc d'IgG et la protéine A. Le surnageant cellulaire (100 ml de culture) est déposé et passé sur une colonne de protéine A-Sepharose à pH 8 (20 mM Tris pH 8, 20 mM NaCl). L'Ac a été élué par une solution d'acide acétique pH 4 (0,1 M acide acétique, 0.15 M NaCl) et récupéré dans des fractions de 1 ml dont chacune a été immédiatement neutralisée avec 120 µl de 2M Tris pH 8. L'Ac purifié a été contrôlé par ELISA et chargé sur un gel de polyacrylamide 5% dans des conditions non dénaturantes et sur un autre de 12% dans des conditions dénaturantes en présence de β mercapto-éthanol.

4.3.15 ELISA (Enzyme-Linked Immuosorbent Assay-indirect)

L'Ac commercial anti-IgG de souris (MILLIPORE) est d'abord incubé sur une plaque multipuits (NUNC- Thermo Scientific) pendant une nuit. Les puits de la plaque sont rincés puis les sites non spécifiques sont saturés par l'addition de lait. Le surnageant à tester est disposé ensuite sur la plaque. Les Ac chimères se comportent comme un antigène reconnu par le réactif fixé à la plaque. L'excès de surnageant est éliminé par rinçage et un Ac secondaire spécifique anti-MoG2A couplé à la peroxydase est ajouté au milieu. Enfin l'ajout du substrat permet par réaction enzymatique de vérifier la présence et de mesurer la concentration de notre Ac.

4.3.16 Extraction protéique

La première étape consiste à broyer et homogénéiser le tissu puis le resuspendre dans 500 µl de tampon de lyse. Un homogénéisateur à piston permet de briser la plupart des cellules de mammifères. Le contenu du tube est bouilli pendant 5 min puis passé environ 10 fois à travers une aiguille 26g pour dissocier les agrégats tissulaires et les amas protéiques. La

centrifugation du mélange à 13000 g pendant 15 min à 4°C sépare 2 phases dont le surnageant (le lysat cellulaire) est transféré dans un nouveau tube propre.

Tampon de lyse : 1% SDS, 1.0 mM sodium ortho-vanadate, 10 mM Tris pH 7.4.

4.3.17 Clonage et dilution limite

Elle consiste à diluer la suspension cellulaire pour qu'on puisse s'attendre statistiquement à une seule cellule par 300 μ l (3 cellules par ml). Chaque clone est ensuite amplifié avant d'être testé pour l'expression du gène d'intérêt. Les clones ayant la meilleure productivité sont ensuite cultivés à grande échelle pour produire les protéines d'intérêt.

4.4 Résultats

4.4.1 Sélection des séquences

Trois séquences pertinentes ont été choisies pour les construire et identifier leurs antigènes cibles (figure 20). L'analyse RT-PCR du répertoire VH-C γ du patient 5 montre une bande monoclonale (05_2A). Cette particularité nous a motivé à cloner et construire cette séquence pour voir sa spécificité antigénique. Nous avons ensuite choisi la séquence 09_15c (Patient 9) qui correspond au clone adventiciel ayant opéré une commutation γ 1- γ 2 (et gardé le même réarrangement VDJ) suggérant que leur antigène cible est un acteur puissant dans la réponse adventicielle. Finalement, les séquences 09_66A et 09_88B (Patient 9) sont représentatives d'une diversification clonale. Elles partagent le même CDR3 mais avec des différentes mutations dans les autres régions. Cette caractéristique nous a incité à identifier et déterminer leur cible vraisemblablement commune en construisant la chaîne 09_66A.

Les réarrangements VDJ de ces séquences ont été associés au promoteur humain et à la région MoG2A. D'autre part, les chaînes légères isolées des patients ont été également construites. Les diverses combinaisons (H+L) associées à un patient ont été transfectées dans les cellules NS0. Cinq chaînes légères fonctionnelles ont été isolées pour chacun des adventices concernés : 3 κ et 2 λ pour le patient 5 et 2 κ et 3 λ pour le patient 9 (tableau 6).

plasmides	VH IMGT	JH IMGT
05_11A	IGLV9-49*01 (non productive)	IGLJ3*02
05_11D	IGLV9-49*01 (non productive)	IGLJ3*02
05_12C	IGLV2-8*01	IGLJ1*01
05_12D	IGLV2-8*01	IGLJ1*01
05_7B	IGKV1-27*01	IGKJ4*01
05_7C	IGKV1-39*01	IGKJ2*01
05_9B	IGKV1-6*011	IGKJ4*01
09_19D	IGKV2-30*01	IGKJ1*01
09_19E	IGKV2-30*01	IGKJ1*01
09_20B	IGLV1-44*01	IGLJ3*02
09_20E	IGLV1-44*01	IGLJ2*01
09_21c	IGLV7-46*01	IGLJ3*02

Tableau 6 : Les chaînes légères isolées des patients (05 et 09) et utilisées dans les constructions.

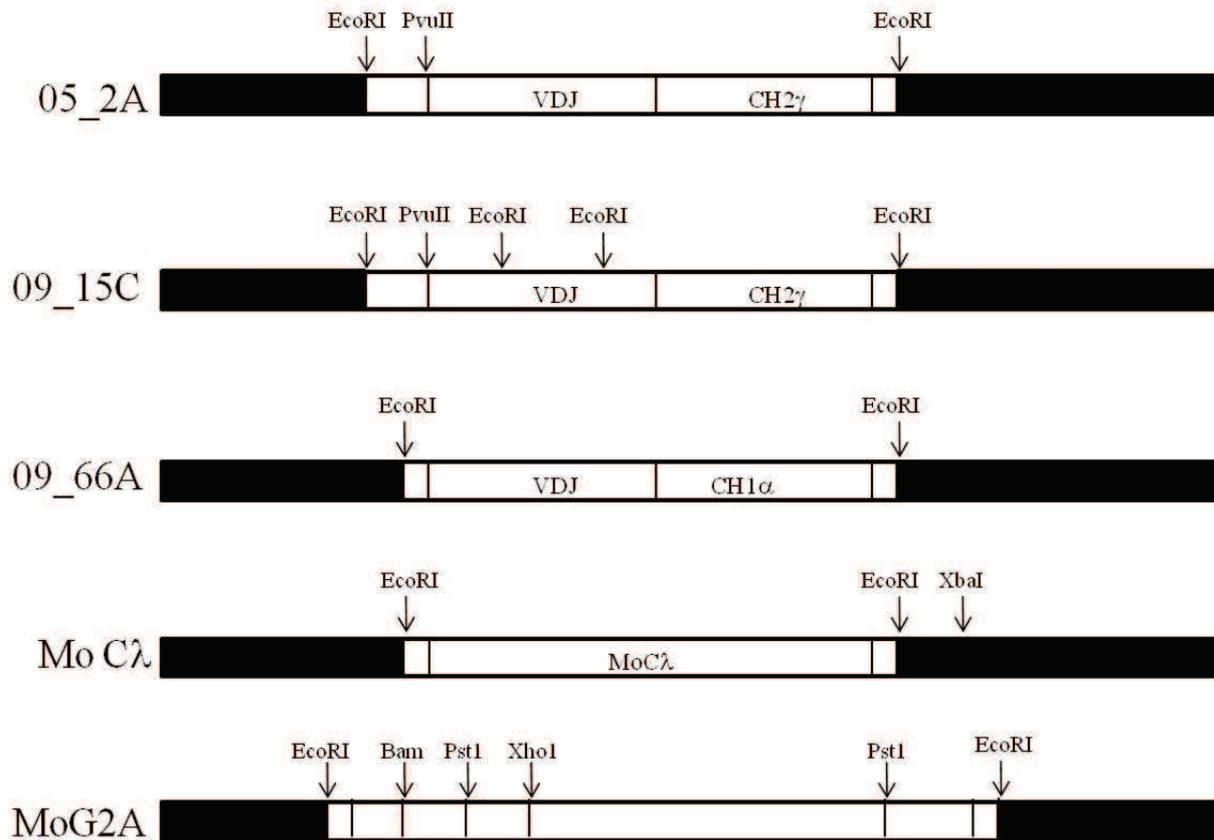


Figure 20 : Matériel génétique de départ. Ces schémas représentatifs montrent la carte de restriction des séquences ainsi que les sites qui ont été utilisés pour la construction des Ig. Les zones noires sont les régions du vecteur PCR®II-TOPO®, limitées par 2 sites EcoRI.

4.4.2 Construction des chaînes légères chimères

Les parties variables λ isolées des patients ont d'abord été assemblées avec le promoteur humain. Cet ensemble est associé à l'activateur humain $E\mu$ puis à la région constante murine lambda ($MoC\lambda$). Chaque fragment généré a été cloné dans le vecteur PCR®II-TOPO®. Ensuite, cet assemblage est inséré dans le vecteur d'expression PSV7-néo.

La première étape consiste à assembler le fragment promoteur (figure 21A-ii) et la partie variable $V\lambda$ (VJ) (figure 21A-i). Ceci est réalisé par la technique d'extension des fragments chevauchants par PCR en utilisant 2 couples d'amorces (2 externes et 2 internes). Ces 2 fragments de PCR ont une zone complémentaire située à l'extrémité 3' du promoteur et 5' de la région variable. L'amplification du mélange de ces 2 produits génère un fragment $V\lambda_{pr}-J\lambda$ d'environ 800 pb (500+300) (figure 21A-iii), qui a été cloné dans un vecteur PCR®II-TOPO®. Ensuite, ce nouveau plasmide (promoteur et région V) et celui du $MoC\lambda$ sont linéarisés par une digestion avec l'enzyme de restriction $XbaI$. Une première ligation assemble les fragments $V\lambda_{pr}-J\lambda$ et $MoC\lambda$. Ce produit est ensuite amplifié (figure 21A-iiii) et cloné dans un vecteur PCR®II-TOPO®. Le criblage d'insert par PCR a été accompli sur une dizaine de clones en utilisant des amorces comprenant un site de restriction $HindIII$ ($Vpr\lambda H3-MoC\lambda H3$). La longueur de la bande attendue ($Vpr\lambda-MoC\lambda_{02as}$) est de 1800 pb (figure 21A-iiii). Parallèlement, l'activateur humain $E\mu$ a été inséré dans le vecteur PSV7-néo à la suite d'une double digestion $BamHI-HindIII$.

Finalement, une digestion $HindIII$ du nouveau plasmide [(PSV7néo-ENH) H3] suivie d'une ligation avec le produit de PCR [($Vpr\lambda H3-MoC\lambda H3$), 1800pb], a permis de transférer la

chaîne légère au vecteur d'expression contenant l'activateur (figure 22A). Toutes ces constructions conservent toujours le même cadre de lecture.

Le séquençage du plasmide final contenant le gène chimère dans la bonne orientation a été effectué comme ultime contrôle. L'analyse des ADN recombinants en utilisant la base de données IMGT, après chaque étape, montre que ces constructions gardent les mêmes CDR et FR que les gènes de départ sans aucune modification. La séquence signal n'est pas exprimée car elle est clivée lors de l'adressage et de l'exportation de l'Ac sécrété. En conclusion, les gènes chimères sont capables de coder des protéines de structure similaire à celle des chaînes isolées à partir des adventices.

De la même façon que pour les gènes λ , le fragment (Vpr κ -J κ) a été amplifié (figure 21B) puis inséré dans un vecteur pMoC κ contenant déjà l'activateur κ 5' de souris associé à l'exon C κ murin, en utilisant les sites HindIII et EcoRI communs à ces deux partenaires (figure 22B).

4.4.3 Développement des chaînes lourdes chimères

La stratégie utilisée pour la construction des chaînes légères a aussi été appliquée pour celle des chaînes lourdes. La région VH (VDJ) a été amplifiée à partir de l'ADNc des patients puis clonée dans un vecteur PCR®II-TOPO®. La construction de chaque chaîne est un cas particulier et est étudiée individuellement. Les étapes ultérieures de construction dépendent de la séquence isolée et de ses sites de restriction. Toutefois, on a toujours besoin, quelque soit la séquence d'origine, d'un vecteur d'expression contenant l'activateur humain 5' et la région constante γ 2a de souris (MoG2A).

Le travail a été fait sur 2 axes en parallèle :

- 1- Création d'un fragment constitué de la partie variable VDJ associée à la région du promoteur.
- 2- Insertion de l'activateur et de la partie constante MoG2A dans le vecteur d'expression PSV7-néo.

Premièrement, le promoteur correspondant à la partie variable a été amplifié à partir de l'ADN génomique humain en utilisant des amorces spécifiques qui amplifient un fragment d'une taille d'environ 550 pb. Ainsi la région amplifiée partage une zone de 20 pb dans la zone FR1 avec le réarrangement VDJ dans les 3 cas de chaînes lourdes.

Pour récupérer la partie VDJ cloné dans du vecteur PCR®II-TOPO®, différentes approches ont été utilisées. Les plasmides 05_2A (VDJ) et 09_15C sont digérés par PvuII (ils ont un site à l'extrémité 5' de la région VDJ) libérant ainsi un fragment de 900 pb (figure 21C-i-1). De l'autre côté, le plasmide 09_66A est digéré par EcoRI permettant la relargation de l'insert (500 pb) (figure 21C-i-2). Ensuite, un mélange des produits de PCR promoteur (Vpr-VH FR1 rev) (figure 21C-ii) et de la digestion de VDJ, est utilisé pour l'amplification Vpr-JH (figure 21C-iii). La longueur de la bande attendue, qui est clonée dans du vecteur PCR®II-TOPO® (plasmide1), est d'environ 800 pb.

Parallèlement (axe 2), l'activateur a été extrait de son plasmide PCR®II-TOPO® et inséré par un clonage directionnel dans le vecteur PSV7-néo. La digestion de ce plasmide (au niveau du site HindIII) permet alors l'insertion de la région MoG2A amplifiée via des amorces contenant des sites de restriction HindIII.

La digestion partielle (09_15C) ou totale (05_2A, 05_66A) par EcoRI du produit de l'axe 1 (plasmide 1), permet son insertion ultérieure au niveau du site EcoRI du vecteur linéaire final (psv7néo + ENH + MoG2A). Le produit final résultant de cette fusion a une taille approximative de 8500 pb (figure 22C).

Le criblage de clones a été réalisé par digestion avec des enzymes de restriction pour vérifier la présence d'insert et par une PCR permettant de sélectionner les clones ayant la bonne orientation après chaque étape. L'analyse et l'alignement des séquences en utilisant l'outil IMGT, confirme l'assemblage correct des différentes régions et l'absence des mutations délétères induites par les amplifications par PCR. Les séquences de ces produits s'alignent parfaitement avec les régions VDJ isolées des patients et les fragments du départ tout en gardant le même cadre de lecture.

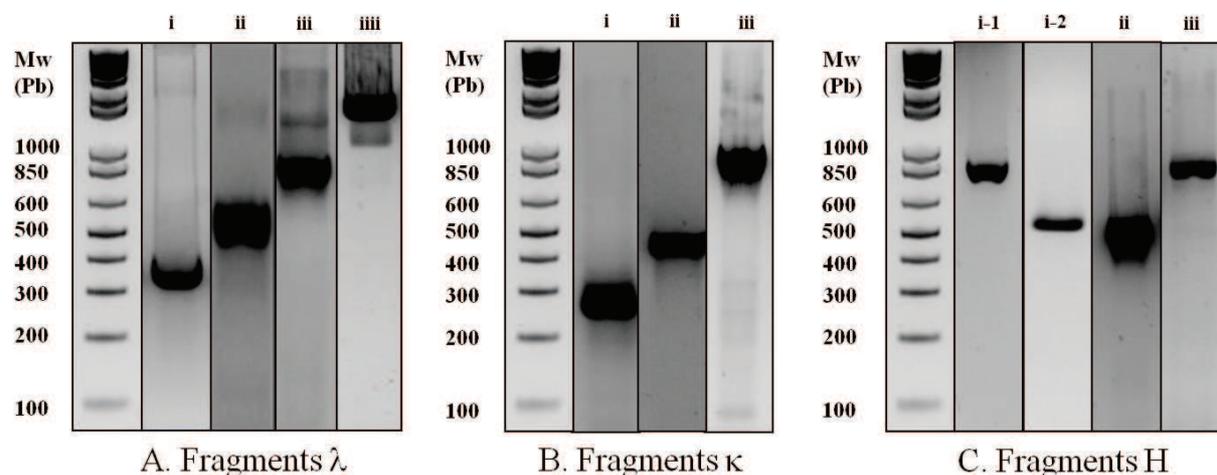


Figure 21 : Amplification des fragments d'ADN constituant les chaînes chimères. Ce schéma représente les différentes étapes qui ont abouti à la formation du vecteur final (λ , κ , H). La région V(D)J d'intérêt isolée soit par PCR (κ et λ) (A-i, B-i) ou digestion enzymatique (chaînes H- C-i-1 et C- i-2), a été associée à la région du promoteur amplifiée à partir de l'ADN génomique humain (ii) puis amplifiée par le couple d'amorces (Vpr - J) (iii). Une PCR supplémentaire est réalisée à la fin pour récupérer la totalité de fragment (Vpr-MoC λ) dans le cas d'une chaîne λ (iii). (pr : promoteur).

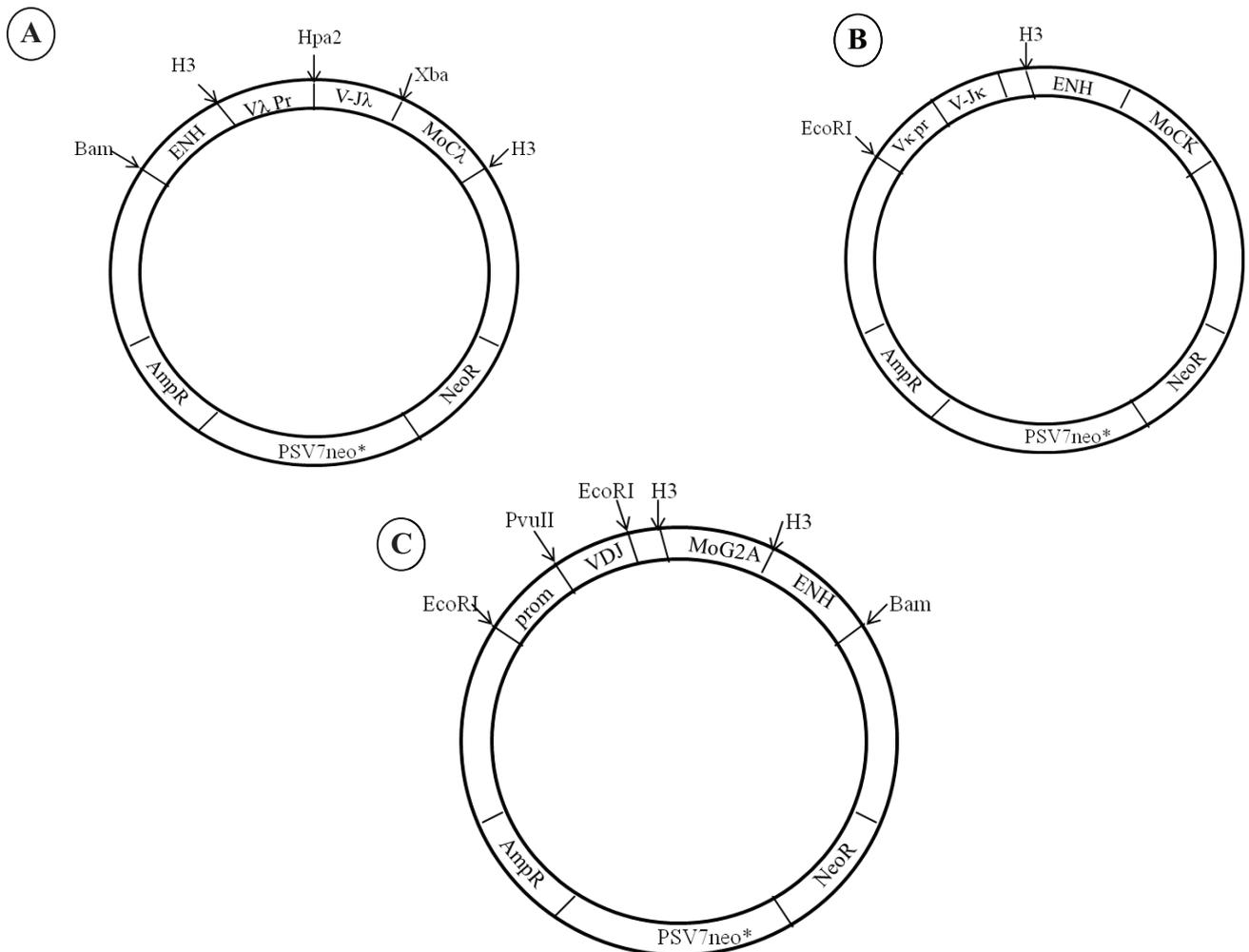


Figure 22 : Constructions finales des différentes chaînes (λ , κ , H). Chaque vecteur d'expression contient la parties variable V(D)J associé au promoteur, l'activateur et la partie constante adaptée. A, B, C correspondent respectivement aux constructions des chaînes λ , κ et H. (NéoR : gène de résistance à la généticine, AmpR: gène de résistance à l'ampicilline).

4.4.4 Expression de l'anticorps chimère

Les plasmides des constructions finales (figure 22) ont été linéarisés par une digestion PvuII dans un site unique situé dans le gène de la β -lactamase du vecteur final. Une électrophorèse sur un gel d'agarose 1% a permis de confirmer la digestion totale de ces plasmides.

Des cellules NS0 ont été co-transfectées avec un mélange équimolaire du couple de plasmides chimères linéaires (H+L) afin de sécréter l'Ac complet. Les différentes combinaisons possibles (H+L) d'un patient ont été réalisées. 48 h après la transfection, les cellules ont été remises en suspension dans un milieu sélectif contenant 0.5 mg/ml G418.

L'analyse (ELISA) du surnageant a permis de détecter l'expression ainsi que la sécrétion stable d'Ac dans trois clones différents (D22, F14, L16) qui correspondent respectivement aux 3 chaînes lourdes de départ (05_2A, 09-15C, 09_66A). Les Ig secrétées sont purifiées sur une colonne de protéine A-Sepharose et analysées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12% et 5%). La première électrophorèse a permis d'analyser les Ig en milieu réducteur (avec β -mercapto-éthanol). Les bandes observées sont à 50 et 25 kDa correspondant respectivement aux chaînes lourdes et chaînes légères (figure 23A).

La deuxième électrophorèse en milieu non réducteur montre une bande à 150 kDa, ce qui correspondrait à l'Ig complète H2L2 (figure 23B).

Les cellules sécrétant un Ac complet sont clonées par dilution limite dans des plaques de 96 puits. La sécrétion des Ac a été surveillée pendant plusieurs mois dans un milieu sélectif validant ainsi l'établissement et la formation de 3 clones stables sécréteurs d'Acs.

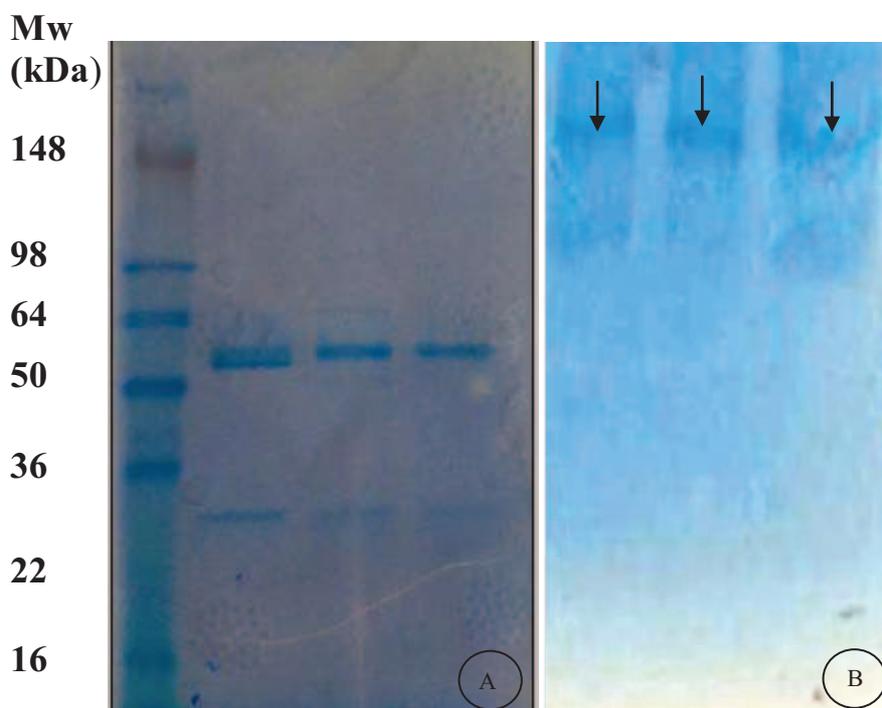


Figure 23 : Analyse des Ig secrétés. A). Expression des 2 chaînes d'immunoglobulines. Le gel révèle les différentes combinaisons (H + L). B). L'électrophorèse en milieu non réducteur montre l'association de 2 chaînes en une seule bande à 150 kDa. L'échelle de masse moléculaire est le Seeblye (Invitrogen).

4.4.5 Identification des antigènes :

Les Ac purifiés sont ensuite utilisés pour essayer d'identifier leurs Ag cibles en utilisant la technique d'immuno-détection sur différents extraits protéiques.

La première expérience faite sur les extraits protéiques des différentes lignées cellulaires (Nalm6, Ramos, BL2, BL14, HL60, CD mature, CD immature) ne révèle aucun signal. Par contre, chaque Ac reconnaît un composant discret sur les extraits protéiques d'artère de rat dans les différentes conditions (réductrices et non réductrices). Les composants détectés ont, pour chaque Ac, une taille différente (figure 24).

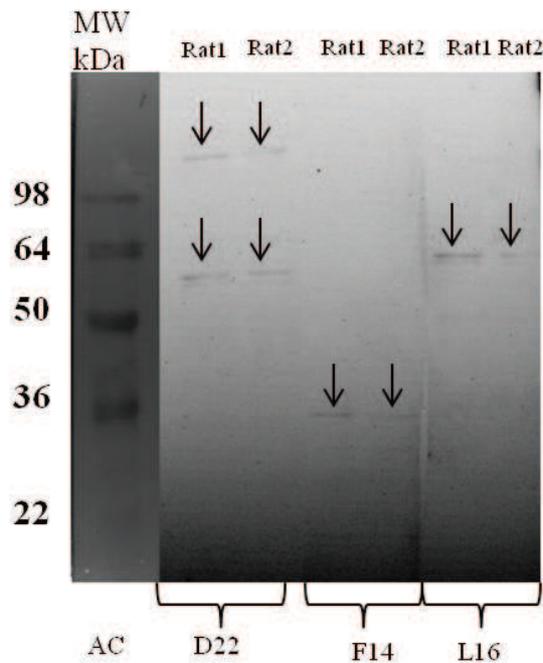


Figure 24 : Immuno-révélation sur les extraits protéiques des artères du rat en utilisant les 3 Ac chimères obtenus (D22, F14, L16). L'échelle de masse moléculaire est le Seebule.

4.5 Discussion

Il y a plusieurs modalités pour produire *In vitro* des Ac (phage display, ScFv...). La mise au point de systèmes et de méthodes d'expression efficaces est essentielle afin d'exploiter au maximum le potentiel de ces molécules. Les paramètres expérimentaux peuvent moduler les fonctions effectrices de l'Ac sans modifier sa spécificité. Le développement d'anticorps thérapeutiques est complexe et nécessite des précautions vue la nécessité d'avoir une molécule similaire à l'Ac humain avec les mêmes modifications post traductionnelles. Notre étude consiste à développer un réactif expérimental spécifique qui nous permettrait d'identifier, *In vitro*, l'antigène ciblé. Pourtant, la production en grande quantité est importante quelles que soient les utilisations ultérieures.

La transfection des constructions finales aux cellules NS0 aboutit à la sécrétion stable, en quantité proche de celle observée pour les hybridomes [640], de 3 différents Ac complets. Les chaînes chimères construites ont une taille proche de celle de chaînes humaines. Ces résultats valident nos démarches et nos constructions des chaînes ainsi que notre choix de la lignée NS0 comme cellule réceptrice possédant toute la machinerie nécessaire pour produire et sécréter différents Acs (humains, murins, chimères).

Note méthode amplifie d'abord les régions d'intérêt de chaque Ac en une première PCR. Les régions sont ensuite assemblées par une deuxième PCR à l'aide des amorces de chaque extrémité de la chaîne chimère. Une autre méthode d'assemblage est la ligation des régions amplifiées. Il était impossible d'associer tous les fragments par une seule ligation. Après plusieurs essais, la meilleure façon de réaliser l'assemblage a été d'effectuer des ligations séparées. Le risque associé était d'augmenter la probabilité d'introduire des mutations dans les séquences puisque chaque produit de ligation était sélectionné et amplifié par PCR. Cependant, l'analyse de séquences des constructions nous a permis de contrôler, par des alignements CLUSTAL, la conservation de la séquence du réarrangement VDJ.

Bien que nous ayons transformé les cellules NS0 avec 15 combinaisons différentes (H+L), nous n'avons obtenu finalement que 3 clones stables producteurs d'Ac. Le premier clone est formé de la combinaison (H : 05_2A et L : 05_12C). Nous avons tenté d'associer 2 chaînes lourdes provenant du patient 9 avec les chaînes légères correspondant à cet adventice. 09-15C est une chaîne d'isotype γ tandis que 09-66A a une région constante α . Les seuls clones obtenus producteurs d'Ig complet résultent de l'association de (H : 09_15c et L : 09_19E) et de l'assemblage (H : 09_66A et L : 09_20B). Donc, 2 chaînes lourdes provenant d'un même patient s'associent avec 2 isotypes différents de chaînes légères (κ : 09_19E et λ : 09_20B). Parmi les différents arrangements, 09_15C a été transfectée séparément avec 2 chaînes légères différant de 2 acides aminés seulement (09_19D et 09_19E). La combinaison (H : 09_15C + L : 09_19E) a abouti à la sécrétion d'un Ac mais pas celle avec 09_19 D. Il est possible que ces différences observées dans 09_19D ne soient pas tolérées par l'Ac et qu'elles aient un impact important au niveau de l'association (H+L). La substitution d'un seul acide aminé dans la région VH ou VL pourrait être suffisante pour modifier l'association et la spécificité. Ces données soulignent le rôle important des mutations somatiques dans l'acquisition de la spécificité antigénique et de l'association (H + L).

L'absence d'un signal lors de l'immuno-détection sur les différentes lignées cellulaires indique que les Ac construits ne reconnaissent pas des protéines constitutives qui sont exprimées dans toutes les cellules (HSP, actine.....). Les Ig produites par les lymphocytes B adventitiels ne semblent pas cibler les Ag majoritairement reconnus par les TCR des plaques (LDLox et les HSP) ou les BCR des plaques qui interagissent avec les LDLox [195, 206], les bactéries et les protéines du cytosquelette (Transgelin 1) [210, 624, 625, 641]. Il semble donc que les antigènes de l'adventice soient différents de ceux de la plaque, ce qui tout à fait concordant avec le résultat du chapitre 3 (article 1) montrant que le répertoire de l'adventice est distinct de celui de la plaque.

La détection spécifique de trois composants sur l'extrait artériel, mais pas sur l'extrait cellulaire, suggère que les Ag reconnus sont des Ag tissulaires. Toutefois, des études ultérieures sont nécessaires pour identifier et caractériser l'expression de ces antigènes. Ces Ac sont hautement spécifiques car ils reconnaissent chacun un constituant unique. Les Ac F16 et L14 sont isolés d'un même patient mais reconnaissent des Ags différents confirmant ainsi l'aspect multifactoriel et multi-antigénique de l'inflammation locale dans l'athérosclérose [203][article 1]. De plus, le même profil de révélation était observé dans des conditions réductrices ou non. Cette interaction constitutive Ac-Ag suggère que les cibles reconnues sont plutôt des épitopes séquentiels indépendants de la structure tertiaire. La faible intensité de la bande peut être due soit au faible degré de similitude moléculaire entre les antigènes humains et ceux du rat, soit à l'expression minoritaire des antigènes d'intérêt.

Toutefois ces résultats montrent clairement la capacité discriminante des Ac construits. Il est intéressant que ces réactifs soient monospécifiques même sur l'extrait de l'artère de rat. L'identification et la caractérisation ultérieure des antigènes est une étape cruciale et importante à la compréhension de l'immunité locale et à sa modulation par les facteurs de risque traditionnels (diabète, tabac, alcool...).

Conclusions et perspectives

5 Conclusions

La cellule B est une cellule multifonctionnelle qui est impliquée dans plusieurs pathologies [568, 569]. Elle peut circuler dans le sang autant que résider dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus périphériques non lymphoïdes. La survie tissulaire des LB est un processus complexe qui nécessite en particulier la stimulation par des antigènes spécifiques. D'autres facteurs déterminants participent aussi au recrutement ainsi qu'à la domiciliation des LB. Les caractéristiques et les fonctions des lymphocytes tissulaires sont encore mal connus.

L'étude récente d'un modèle murin a dévoilé la contribution active des LB résidents à l'évolution de la maladie athéromateuse [176]. Cependant, la pathologie humaine diffère de celle de modèles expérimentaux. De plus, les propriétés fonctionnelles et phénotypiques des lymphocytes ainsi que leurs conditions d'activation varient entre les différentes espèces [12]. L'étude humaine est donc une étape essentielle et indispensable pour explorer les cellules résidentes et confronter nos résultats à ceux des modèles murins.

Notre étude est la première à s'intéresser à l'analyse de l'expression des Ig (isotypes et répertoire) ainsi qu'à la caractérisation des cellules B adventitielles alors que des études précédentes se sont seulement intéressées au répertoire des IgG au sein des plaques athéromateuses. Nous montrons que la sécrétion locale d'IgA est une caractéristique commune à tous les patients et associe les sous-classes IgA1 et IgA2. L'IgG est détectée dans la majorité des adventices tandis que la production d'IgM est souvent absente. Une réponse IgA au sein de la paroi artérielle était inattendue alors que cet isotype est principalement présent et sécrété dans la muqueuse intestinale [529]. Bien que l'IgA soit souvent associée à un effet protecteur dans le tube digestif [536], son rôle dans l'athérogenèse n'a pas encore été décrit. Il n'existe pas actuellement d'étude clinique appréciant le rôle de l'IgA, en particulier celle d'origine locale. La sécrétion locale des différents isotypes est favorisée par l'existence d'environnements cytokiniques compatibles (IL-4, IFN- γ , TGF- β). D'autre part, des effets opposés ont été attribués à l'IgG sérique (anti-LDLox) [84, 212, 222, 223]. Pourtant, ces études systémiques et cliniques ne reflètent pas forcément la contribution des déterminants de l'inflammation locale.

L'analyse des répertoires VH et VL montre la domiciliation adventitielle d'un nombre restreint de clones des LB, une observation qu'il faut tempérer en prenant en compte la petite taille des échantillons étudiés. Cette restriction du BCR s'accorde avec les données montrant une oligoclonalité du TCR des cellules locales [195, 206]. Les lymphocytes B locaux sont majoritairement des cellules B2 qui secrètent des anticorps hypermutés différents des anticorps naturels sécrétés par les cellules B1, ce qui est tout à fait compatible avec l'absence des marqueurs CD5 et CD27 exprimés respectivement sur les cellules B1 et MZ. Un autre point, méritant également d'être mentionné, est la coexistence de la production de petites quantités d'IgM naturelle et d'IgM hypermutée par les cellules B résidentes.

Les cellules B2 transférées de souris *ApoE*^{-/-} à des souris immuno-déficientes se domicilent dans les lésions vasculaires et aggravent la maladie [198]. A l'inverse, Doran et al. ont suggéré un rôle protecteur des cellules B résidentes [176]. Ce paradoxe révèle que le rôle des LB dépend du contexte. Il est possible que l'effet de sous populations de cellules B dépende de l'isotype sécrété.

Par ailleurs, ces cellules B résidentes ont des effets indépendants des Ac en sécrétant des cytokines inflammatoires (IL-6, GM-CSF, TNF- α). La cellule B productrice d'IL-6, joue un rôle délétère majeur dans les maladies auto-immunes [291] suggérant ainsi une contribution pro-athérogène de cellules B adventitielles. Une étude récente a également démontré que les cellules IgA⁺ intestinales sécrètent les médiateurs inflammatoires TNF- α et la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) [642]. Bien que nous n'ayons pas détecté une sécrétion d'iNOS par les LB artériels, l'analyse par RT-PCR montre qu'ils expriment du TNF- α . Les lymphocytes B1 peuvent sécréter du GM-CSF au cours d'infections microbiennes [643]. Dans les lésions d'athérosclérose, nous avons détecté l'expression de cette cytokine dans les cellules B2 résidentes sécrétrices d'IgG et d'IgA (patient 15 et 16b). Ce profil cytokinique inflammatoire des LB pourrait être expliqué par l'absence de cellules B1 inhibitrices de l'inflammation [644]. La présence inconstante de ces cytokines chez les patients pourrait être due aux différences d'âge des lésions et de profil de chaque individu. Toutefois, l'absence des cytokines suppressives (IL-10 et TGF- β) est une caractéristique commune à tous les patients.

Actuellement, il est difficile d'attribuer un rôle définitif à chacune des voies (Ac ou cytokines), d'autant que la contribution pathologique des cytokines reste encore ambiguë et dépende du modèle utilisé.

La domiciliation sélective, l'expression d'AID, la maturation d'affinité, la commutation de classe, la diversification clonale sont des caractéristiques de la réponse humorale adventitielle. Globalement, les comparaisons des séquences des régions V suggèrent une évolution clonale et une maturation loco-régionale (directement dans l'adventice ou avec des phases de migration dans les ganglions drainants) des cellules B sous pression antigénique. Quel que soit le trafic cellulaire, la détection d'AID qui est exprimé transitoirement durant la maturation des cellules B ainsi que la commutation de classe $\gamma 1$ - $\gamma 2$ sont des preuves de modifications intra-adventitielles.

Les réseaux de canaux entre l'intima et l'adventice laissent passer de petits antigènes et molécules solubles [170, 645, 646] permettant des échanges entre les deux tuniques. Les Ig seraient de taille trop importante pour traverser ce réseau. Notre étude d'isotypes exprimés et du répertoire ainsi que de l'immuno-détection montre aussi que les cellules B ne circulent pas entre l'adventice et la plaque. Bien que certaines régions V soient utilisées à la fois dans nos séquences isolées des adventices et celles isolées des plaques par Burioni [189], elles ne montrent pas de similitude des portions CDR3. Il semble donc que les LB se répartissent de manière différentielle entre les différents compartiments (adventice/plaque). Cette hypothèse est aussi supportée par l'immuno-détection qui suggère que l'HSP est un antigène majeur de la plaque mais pas de l'adventice [239, 625].

La déplétion en cellules B est utilisée couramment pour le traitement des maladies auto-immunes chez l'homme [647, 648]. Cette intervention est également efficace pour modifier l'évolution de l'athérosclérose murine. Pourtant, il n'y a pas encore de données cliniques qui évaluent l'effet de l'anti-CD20 dans le cas de l'athérosclérose humaine. Cette approche se confronte à plusieurs obstacles et paramètres limitants. La période d'intervention est le premier facteur déterminant des effets induits. Quoique l'anti-CD20 cible la majorité des cellules B circulantes, son degré d'accessibilité et d'efficacité sur les lymphocytes artériels reste inconnu. De plus, notre étude montre que les cellules B adventitielles (au moment de la chirurgie) n'expriment pas CD20. L'analyse par RT-PCR montre aussi l'absence de

marqueurs conventionnels des cellules mémoires (CD27, BCL-6) et des plasmocytes (CD138, Blimp-1), et les lymphocytes B adventitiels ressemblent alors à des plasmablastes CD20 négatif.

6 Perspectives

L'identification d'antigènes des LB résidents chez un patient permettrait de comparer la réponse locale à la réponse systémique. La recherche d'antigènes nécessite l'utilisation des anticorps sur des extraits protéiques, sur des coupes histologiques d'artères saines et pathologiques et sur des puces à protéines de densité élevée, suivie par spectrométrie de masse. La réalisation de ce travail sur une large cohorte de patients serait indispensable pour repérer les antigènes ou les épitopes récurrents, s'ils existent. Les maladies auto-immunes présentent une succession de phases cliniques et la rupture de la tolérance aux antigènes a lieu seulement à des stades tardifs [170, 649]. Il est possible que des LB auto-réactifs soient générés à des phases avancées et contribuent à la progression de l'athérosclérose comme c'est le cas pour les maladies auto-immunes [170, 649]. Enfin, nos échantillons sont uniquement carotidiens et pourraient avoir des caractéristiques différentes de celles des autres artères. La nature et l'abondance des Ags ainsi que leur accessibilité aux cellules immunitaires, peuvent déterminer l'évolution hétérogène de l'athérosclérose au sein de différents sites anatomiques du même patient.

Par ailleurs, l'étude des chimiokines impliquées dans le recrutement sélectif des LB dans la plaque et l'adventice chez l'homme est aussi une perspective passionnante. Chez les souris *Apoe*^{-/-}, CCL20 (ligand du récepteur CCR6) est responsable de l'attraction des LB adventitiels dans les phases précoces tandis que CXCL13 et CCL21 (ligands des récepteurs CXCR5 et CCR7 respectivement) sont plutôt impliquées dans l'organisation de l'ATLO à des stades avancés. De plus, l'expression de récepteurs de chimiokines différents à la surface des cellules B nous informerait sur leur devenir (CXCR4 responsable de la migration vers la moelle osseuse) ainsi que sur la possibilité d'agir sélectivement sur leur domiciliation et de moduler l'inflammation adventitielle.

L'adventice est aussi riche en récepteurs TLR dont l'activation contribue à déstabiliser la plaque [160]. Ces récepteurs sont stimulés par plusieurs molécules (lipides, carbohydrates, ADN) possédant des motifs PAMP ou DAMP parmi lesquelles on trouve des antigènes potentiels de l'athérosclérose (LDLox, GPI...). Pourtant, l'activation spécifique des TLR des lymphocytes B est capable d'induire la sécrétion d'IL-10 inhibant l'inflammation et la progression de la maladie [650]. L'analyse de la contribution des LB à cette voie nécessiterait l'identification des TLR exprimés.

Des clones adventitiels (IgA+) ont aussi été facilement détectés dans les ganglions. Bien qu'il soit difficile d'établir leur sens de circulation et leur lieu de maturation, il serait intéressant de déterminer s'ils circulent dans le sang et s'ils peuvent être utilisés pour le diagnostic de cette pathologie.

Une étude approfondie des anticorps et des cytokines sécrétées pourrait être réalisée par l'utilisation de modèles murins. Premièrement, il faudrait vérifier si nos résultats s'appliquent aussi aux souris *Apoe*^{-/-} et y mettre en évidence une éventuelle sécrétion locale d'IgA. Le rôle particulier de chaque isotype d'Ig pourrait être étudié à l'aide de souris *Igα*^{-/-} ou *Igγ*^{-/-} ou plus particulièrement en transférant des LB mutés (*Igα*^{-/-} ou *Igγ*^{-/-}) à des souris *Apoe*^{-/-} *Id3*^{-/-}.

D'autre part, les LB peuvent aussi moduler l'attraction cellulaire par leur production cytokinique. L'isolation directe par microdissection capture laser (MCL) de cellules homogènes de même isotype (après immunohistochimie anti-IgA et anti-IgG) permettra d'établir une corrélation entre les isotypes et les cytokines secrétées. Les données disponibles sur le rôle des LB (murins et humains) nécessitent un réexamen de la cinétique d'infiltration des différentes sous populations de LB. Cette approche établirait la chronologie du recrutement et de la domiciliation des cellules B. En effet, ces dernières peuvent être parmi les acteurs précoces de la réponse immune en inhibant [176] ou amplifiant l'inflammation et l'accumulation de macrophages [198]. Il est tout à fait raisonnable d'étudier *in vitro* le dialogue entre les cellules B adventitielles et les macrophages après isolation à partir de souris *Apoe^{-/-}*. L'inactivation spécifique de ces cytokines dans les cellules B permettrait de définir leur impact sur la progression de la maladie. De plus, la caractérisation et l'analyse chronologique des propriétés de LB résidents permettraient de comprendre leur rôle et d'optimiser les traitements immunologiques.

Les changements et modifications locales résultent de l'activation et de la formation de diverses formes de TLO (ou CG) dans l'adventice où s'accumulent les cellules immunitaires [651-656]. Ces structures peuvent se développer dans divers sites et tissus en réponse à une inflammation chronique en particulier lors des maladies auto-immunes [653, 657-659]. Leur formation, souvent accompagnée de la destruction des organes, est aussi bien corrélée à l'infiltration adventitielle de LB durant l'athérosclérose [170, 172, 180]. Les agrégats de cellules B et les auto-anticorps sont des facteurs potentiels d'érosion endothéliale et de rupture des plaques [170] justifiant ainsi l'étude du rôle des LB dans la né-organogenèse et la thrombose. Les mécanismes de développement et d'organisation des ATLO dans l'athérosclérose humaine restent encore à déterminer. La présence de cellules B est essentielle et suffisante pour induire la différenciation et la maturation de FDC [293, 294]. Les LB peuvent également agir comme des CPA pour les LT et les NK [201, 202]. Il serait intéressant d'isoler les LB pour analyser leur expression de molécules de co-stimulation afin de nous renseigner sur la capacité des cellules B à se comporter comme des CPA. En plus, elles pourraient également sécréter, à certaines périodes de l'évolution des plaques, de la LT- α qui est indispensable à la formation de TLO [294, 296]. Il faudrait invalider les LT (α et β) spécifiquement dans les LB. Cependant, des informations supplémentaires pourraient provenir de l'étude des souris chimères déficientes en anticorps seulement, en remplaçant la région JH avec la protéine LMP2A d'Epstein Barr Virus (EBV). Ces souris représentent un meilleur modèle que celles déficientes en C μ car elles conservent une architecture normale des tissus lymphoïdes, permettant ainsi d'apprécier le rôle des différents médiateurs sécrétés par les LB. D'autre part, le rôle potentiel des auto-anticorps rend nécessaire l'injection des Acs chimères identifiés à des souris à phases avancées d'athérosclérose, pour évaluer leur contribution potentielle aux accidents vasculaires.

Les récepteurs de BAFF (B-cell activating factor) et d'APRIL (a proliferation-inducing ligand) sont exprimés principalement sur les cellules B. L'expression de BCMA (B cell maturation antigen) et de TACI (TNFR homolog transmembrane activator) est faible sur les cellules B immatures mais augmente progressivement durant le développement des cellules B périphériques. BAFF et APRIL induisent la différenciation et la prolifération des cellules B. BAFF est nécessaire pour le développement et la maturation périphérique des cellules B *in vivo*. Pourtant, la surexpression de BAFF chez la souris induit le développement murin des

maladies autoimmunes (lupus, arthrite). Les antagonistes ou les modulateurs sont des candidats thérapeutiques intéressants ciblant les cellules B dans les maladies autoimmunes [660]. D'une manière intéressante, l'inactivation du récepteur du BAFF est associée à une déficience des cellules B2 et une diminution de la taille des lésions dans les souris *ApoE*^{-/-}, confirmant ainsi l'effet athérogène des cellules B2 et la participation de la voie BAFF/APRIL à l'évolution de la maladie [661, 662]. Cette conclusion nécessite une recherche plus approfondie pour évaluer la contribution de la voie BAFF/APRIL à la différenciation des cellules B et à la sécrétion de différents isotypes.

Une intervention anti-CD20 ne pourrait être efficace qu'aux étapes précoces de l'évolution de la maladie. L'absence de la molécule CD20 sur les lymphocytes résidents aux stades avancés de l'athérosclérose rend nécessaire l'étude d'autres marqueurs des sous populations B. Le traitement anti-CD20 ne permet cependant pas la distinction ou la déplétion sélective des sous populations de LB. Pourtant, d'autres approches (anti-CD19 et anti-CD22) ciblant sélectivement des sous populations des cellules B (B2, B activées) mériteraient d'être essayés sur les modèles murins d'athérosclérose. Enfin, une étude clinique corrélant les caractéristiques des cellules B résidentes et le profil métabolique de chaque patient (obèse, diabétique) pourrait nous aider à comprendre l'effet des différents facteurs de risque sur l'inflammation locale.

Annexe

PCR	Amorce Forward 01s 5'---3'	Amorce Reverse 02as 5'---3'
VH3-66 pr - JH4 don BamH1	ATCTCCCCCAGGAGACTTCA	GGGATCCCGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCAG
VH3-72 pr - JH5 don BamH1	CCTGAGAGATAGGATTACTGCC	GGGATCCCGGTTGTGAGGACTCACCCAGAGGAGACGGTGACCAG
VH3-23 pr - JH4 don BamH1	CACAGATCTCCCCGAGGACAT	GGGATCCCGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTGACCAG
Vκ1-27 pr - Jκ4 don H3	GAGATGTTTTTCCCTAGCAGACC	GGGAAGCTTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATCTCCACCTCGGTCCC
Vλ2-8 pr - Jλ1 don BamH1	GTGCCCAGGCCTGGAGGTCAC	GGGATCCTTGAGAGCCACTTACCTAGGACGGTGACCTGGTC
Vκ1-39 pr - Jκ2 don H3	GAAGGCCTGATAGACCACC	GGGAAGCTTAAAAAGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTGGTCC
Vκ1-6 pr - Jκ4 don H3	CCCCTTCCCTAAATGGAATC	GGGAAGCTTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATCTCCACCTGGTCCC
Vκ2-30 pr - Jκ1 don H3	TGAAAGGGCCAAATCTGAAC	GGGAAGCTTAAATTTACTACGATGATTTCCACCTGGTC
Vλ1-44 pr H3 - Jλ3 don Xba1	GGAAGCTTCACACCTGACATCCTCAAG	GGTCTAGAGAGAAGAGACTCACCTAGGACGGTCAGCTGGTC
Vλ1-44 pr H3 - Jλ3bis don Xba1	GGAAGCTTCACACCTGACATCCTCAAG	GGTCTAGAGAGAAGAGACTCACCTAGGACGGTCAGCTGGTC
Vλ7-46 pr H3 03s - Jλ3don Xba1	GGAAGCTTGTTCAAACCTAATGAACCTGTC	GGTCTAGAGAGAAGAGACTCACCTAGGACGGTCAGCTGGTC
VH3-66 pr - VH3 FR1	ATCTCCCCCAGGAGACTTCA	CAGAGGCTGCACAGGAGAGTC
VH3-23 pr - VH3 FR1	CACAGATCTCCCCGAGGACAT	CCAGAGGCTGCACAGGAGAGTC
VH3-72 pr -VH3 FR1	CCTGAGAGATAGGATTACTGCC	CAGAGGCTGCACAGGAGAGTC
Vκ1-27 pr - Vκ1-27 FR1	GAGATGTTTTTCCCTAGCAGACC	AATGCCCTGACTCGCCCGGCAAG
Vκ1-39 pr -Vκ1-39 FR1	GAAGGCCTGATAGACCACC	CAGATGCAGACAGGAGGATGG
Vκ1-6 pr -Vκ1-6 FR1	CCCCTTCCCTAAATGGAATC	GCAAGTGATGGTGACTCTGTCTCC
Vκ2-30 pr -Vκ2-30 FR1	TGAAAGGGCCAAATCTGAAC	AGGCTTTGACTAGACCTGCAG
Vλ1-44 pr -Vλ1-44 FR1	GGAAGCTTCACACCTGACATCCTCAAG	GGGGTCCCAGACGCTGAGGGT
Vλ2-8 pr -Vλ2-8 FR1	GTGCCCAGGCCTGGAGGTCAC	CTGGTCCAGTGCAGGAGATGGTGAC
Vλ7-46 pr -Vλ7-46 FR1	GGAAGCTTGTTCAAACCTAATGAACCTGTC	ACAGGTGAGAGTGACTGTCC
Vλ1-44 pr H3 - MoCλ H3	GGAAGCTTCACACCTGACATCCTCAAG	CCAAGCTTGCCAAGACATTCACACACTAC
Vλ2-8 pr H3 - MoCλ H3	CCAAGCTTGTCAGGCTGGAGGGTCAC	CCAAGCTTGCCAAGACATTCACACACTAC
Vλ7-46 pr H3 - MoCλ H3	GGAAGCTTGTTCAAACCTAATGAACCTGTC	CCAAGCTTGCCAAGACATTCACACACTAC
MoG2A	GAGGAGGAAGGTGCTTACCCTG	GGCTGTCTCCAACCTGGCCAG
MoG2A H3	CCAAGCTTGAGGAGGAAGGTGCTTACCC	CCAAGCTTGGCTGTCTCCAACCTGGCC
MoCλ	CGCAGAGAGGATTCAAGAGCTGG	GCCAAGACATTCACACACTAC
Hu ENH BamH1-Hu ENH	GGGATCCTGCTACTGCTGGGGTTTC	CCAAGCTTGGCTGTCTCCAACCTGGCC

Tableau 1 : Oligonucléotides utilisées pour les constructions d'anticorps. Les bases soulignées indiquent les sites de restriction des enzymes correspondantes affichées dans la première case.

BIBLIOGRAPHIE

7 Références bibliographiques

- [1] Anderson GF, Chu E. Expanding priorities - Confronting chronic disease in countries with low income. *New England Journal of Medicine* 2007;356:209.
- [2] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y, Writing Grp M, Amer Heart Assoc Stat C, Stroke Stat S. Heart Disease and Stroke Statistics-2009 Update A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2009;119:480.
- [3] Emmerich J. L'athérosclérose. *Pathologie Science.*: Paris : John Libbey Eurotext., 2000.
- [4] Murray CJL, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1436.
- [5] Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AKL, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature Medicine* 2006;12:178.
- [6] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease - Reply. *New England Journal of Medicine* 2005;353:429.
- [7] Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M, Watanabe H. WHHL- rabbit - A low density lipoprotein receptor-deficient animal-model for familial hypercholesterolemia. *Febs Letters* 1980;118:81.
- [8] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2004;55:503.
- [9] Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein-E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992;71:343.
- [10] Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low-density-lipoprotein receptor-negative mice. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:1885.
- [11] Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2007;27:2079.

- [12] Maria Wigren JN, Daniel Kolbus. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 2012.
- [13] Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annual Review of Immunology* 2009;27:165.
- [14] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 1996;20:707.
- [15] Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia - Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100:2680.
- [16] Steinberg D. A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1997;131:S5.
- [17] Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis - basic mechanisms - oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995;91:2488.
- [18] Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: An overview. *Free Radical Biology and Medicine* 2000;28:1815.
- [19] Mestas J, Ley K. Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2008;18:228.
- [20] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 2006;6:508.
- [21] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation Research* 2004;95:858.
- [22] Charo IF, Ransohoff RM. Mechanisms of disease - The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine* 2006;354:610.
- [23] Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, Hynes RO, Schaefer EJ, Wagner DD. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:1037.
- [24] Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. Combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102:145.

- [25] Cybulsky MI, Iiyama K, Li HM, Zhu SN, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2001;107:1255.
- [26] Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71.
- [27] Ylitalo R, Oksala O, Ylaherttuala S, Ylitalo P. Effects of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 1994;123:769.
- [28] Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6C(hi) monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:195.
- [29] Lesnik P, Haskell CA, Charo IF. Decreased atherosclerosis in CX(3)CR1(-/-) mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 2003;111:333.
- [30] Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008;117:1649.
- [31] Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 2009;27:669.
- [32] Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage-colony stimulating factor (op) and apolipoprotein-E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:8264.
- [33] Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the Migration and Survival of Monocyte Subsets by Chemokine Receptors and Its Relevance to Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2009;29:1412.
- [34] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation Research* 2002;91:281.
- [35] Johnson JL, Newby AC. Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Current Opinion in Lipidology* 2009;20:370.
- [36] Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annual Review of Physiology* 1995;57:791.
- [37] Ross R. Mechanisms of disease - Atherosclerosis - An inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 1999;340:115.

- [38] Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* 2001;104:503.
- [39] Moore KJ, Kunjathoor VV, Koehn SL, Manning JJ, Tseng AA, Silver JM, McKee M, Freeman MW. Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:2192.
- [40] Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, You HL, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *American Journal of Pathology* 2000;157:1259.
- [41] Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis - The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25:2255.
- [42] Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Reviews Immunology* 2010;10:36.
- [43] Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25:174.
- [44] Gautier EL, Huby T, Witztum JL, Ouzilleau B, Miller ER, Saint-Charles F, Aucouturier P, Chapman MJ, Lesnik P. Macrophage Apoptosis Exerts Divergent Effects on Atherogenesis as a Function of Lesion Stage. *Circulation* 2009;119:1795.
- [45] Fougerat A, Gayral S, Malet N, Briand-Mesange F, Breton-Douillon M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis? *Clinical Science* 2009;116:791.
- [46] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YT, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2000;18:767.
- [47] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology* 2003;21:685.
- [48] Bobryshev YV, Lord RSA. Ultrastructural recognition of cells with dendritic cell morphology in human aortic intima contacting interactions of vascular dendritic cells in athero-resistant and athero-prone areas of the normal aorta. *Archives of Histology and Cytology* 1995;58:307.
- [49] Bobryshev YV, Lord RSA. Langhans cells of human arterial intima: Uniform by stellate appearance but different by nature. *Tissue & Cell* 1996;28:177.

- [50] Bobryshev YV, Lord RSA. Structural heterogeneity and contacting interactions of vascular dendritic cells in early atherosclerotic lesions of the human aorta. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1996;28:49.
- [51] Van Vre EA, Bosmans JM, Van Brussel I, Maris M, De Meyer GRY, Van Schil PE, Vrints CJ, Bult H. Immunohistochemical characterisation of dendritic cells in human atherosclerotic lesions: possible pitfalls. *Pathology* 2011;43:239.
- [52] Van Vre EA, Van Brussel I, Bosmans JM, Vrints CJ, Bult H. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques. *Mediators of inflammation* 2011;2011:941396.
- [53] Lord RSA, Bobryshev YV. Clustering of dendritic cells in athero-prone areas of the aorta. *Atherosclerosis* 1999;146:197.
- [54] Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlichs CD. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis* 2004;176:101.
- [55] Bobryshev YV. Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance. *European Heart Journal* 2005;26:1700.
- [56] Millonig G, Niederegger H, Rabl W, Hochleitner BW, Hoefler D, Romani N, Wick G. Network of vascular-associated dendritic cells in intima of healthy young individuals. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:503.
- [57] Millonig G, Malcom GT, Wick G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis* 2002;160:441.
- [58] Waltner-Romen M, Falkensammer G, Rabl W, Wick G. A previously unrecognized site of local accumulation of mononuclear cells: the vascular-associated lymphoid tissue. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1998;46:1347.
- [59] Millonig G, Schwenter C, Mueller P, Mayerl C, Wick G. The vascular-associated lymphoid tissue: a new site of local immunity. *Current Opinion in Lipidology* 2001;12:547.
- [60] Liu P, Yu Y-RA, Spencer JA, Johnson AE, Vallanat CT, Fong AM, Patterson C, Patel DD. CX(3)CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2008;28:243.
- [61] Gautier EL, Huby T, Saint-Charles F, Ouzilleau B, Pirault J, Deswaerte V, Ginhoux F, Miller ER, Witztum JL, Chapman MJ, Lesnik P. Conventional Dendritic Cells at the Crossroads Between Immunity and Cholesterol Homeostasis in Atherosclerosis. *Circulation* 2009;119:2367.

- [62] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:678.
- [63] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2(-/-) mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894.
- [64] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular Cell* 1998;2:275.
- [65] Veillard NR, Steffens S, Pelli G, Lu B, Kwak BR, Gerard C, Charo IF, Mach F. Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation* 2005;112:870.
- [66] Van Wanrooij EJA, de Jager SCA, van Es T, de Vos P, Birch HL, Owen DA, Watson RJ, Biessen EAL, Chapman GA, van Berkel TJC, Kuiper J. CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2008;28:251.
- [67] Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis. *Seminars in Immunopathology* 2009;31:23.
- [68] Robertson A-KL, Hansson GK. T cells in atherogenesis - For better or for worse? *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2006;26:2421.
- [69] Zhou XH, Nicoletti A, Elhage R, Hansson GK. Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000;102:2919.
- [70] Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang HY, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL, Weyand CM. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation* 2000;101.
- [71] Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:2752.
- [72] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* 2006;86:515.
- [73] Binder CJ, Hartvigsen K, Chang MK, Miller M, Broide D, Palinski W, Curtiss LK, Corr M, Witztum JL. IL-5 links adaptive and natural immunity specific for epitopes of oxidized LDL and protects from atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2004;114:427.

- [74] Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Pathology* 2003;163:1117.
- [75] Elhage R, Jawien J, Rudling M, Ljunggren HG, Takeda K, Akira S, Bayard F, Hansson GK. Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovascular Research* 2003;59:234.
- [76] Lee TS, Yen HC, Pan CC, Chau LY. The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:734.
- [77] Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice through release of interferon-gamma. *Circulation Research* 2002;90:E34.
- [78] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, Tedgui A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 2001;104:1598.
- [79] Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, Tedgui A. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circulation Research* 2001;89:E41.
- [80] Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ, AtheroGene I. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 2002;106:24.
- [81] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Tiret L, Meyer J. Serum interleukin-18 is a strong and independent predictor of future cardiovascular events. *European Heart Journal* 2002;23:134.
- [82] Buono C, Binder CJ, Stavrakis G, Witztum JL, Glimcher LH, Lichtman AH. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:1596.
- [83] Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *Journal of Clinical Investigation* 2002;109:745.
- [84] Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low-density-lipoprotein (LDL) receptor-deficient rabbits with homologous malondialdehyde-modified LDL reduces atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:821.

- [85] George J, Afek A, Gilburd B, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, Kopolovic Y, Wick G, Shoenfeld Y, Harats D. Hyperimmunization of apo-E-deficient mice with homologous malondialdehyde low-density lipoprotein suppresses early atherogenesis. *Atherosclerosis* 1998;138:147.
- [86] Daugherty A, Rateri DL. T lymphocytes in atherosclerosis - The yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circulation Research* 2002;90:1039.
- [87] Zhou XH, Paulsson G, Stemme S, Hansson GK. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1 Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E knockout mice. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:1717.
- [88] King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22:456.
- [89] Knoflach M, Kiechl S, Mayr A, Willeit J, Poewe W, Wick G. Allergic rhinitis, asthma, and atherosclerosis in the Bruneck and ARMY studies. *Archives of Internal Medicine* 2005;165:2521.
- [90] Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. Regulatory T cell responses: potential role in the control of atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2005;16:518.
- [91] von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunology* 2005;6:338.
- [92] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431.
- [93] Mallat Z, Taleb S, Ait-Oufella H, Tedgui A. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* 2009;50:S364.
- [94] Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *International Reviews of Immunology* 2005;24:211.
- [95] Groux H, Ogarra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, deVries JE, Roncarolo MG. A CD4(+) T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997;389:737.
- [96] Maron R, Sukhova G, Faria AM, Hoffmann E, Mach F, Libby P, Weiner HL. Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 2002;106:1708.
- [97] Tournoy KG, Provoost S, Van Hove C, Joos G. The role of immune tolerance in asthma pathogenesis. *Current Allergy and Asthma Reports* 2006;6:437.

- [98] Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews* 2001;182:207.
- [99] Mallat Z, Heymes C, Ohan J, Faggini E, Leseche G, Tedgui A. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques - Relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:611.
- [100] Potteaux S, Deleuze V, Merval W, Bureau MF, Esposito B, Scherman D, Tedgui A, Mallat Z. In vivo electrotransfer of interleukin-10 cDNA prevents endothelial upregulation of activated NF-kappa B and adhesion molecules following an atherogenic diet. *European Cytokine Network* 2006;17:13.
- [101] Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T, Hagenbaugh A, Territo M, Berliner JA, Fyfe AI. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1999;19:2847.
- [102] 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. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:1474.
- [103] 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. *Circulation Research* 2002;90:1064.
- [104] Mallat Z, Gojova A, Brun V, Esposito B, Fournier N, Cottrez F, Tedgui A, Groux H. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 2003;108:1232.
- [105] Ait-Oufella H, Horvat B, Kerdiles Y, Herbin O, Gourdy P, Khallou-Laschet J, Merval R, Esposito B, Tedgui A, Mallat Z. Measles virus nucleoprotein induces a regulatory immune response and reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* 2007;116:1707.
- [106] Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine* 2008;263:489.
- [107] van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJM, Bootsma-van der Wiel A, Frolich M, Westendorp RGJ. Inflammation and stroke - The Leiden 85-plus study. *Stroke* 2002;33:1135.
- [108] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, Zeiher AM, Investigators CS. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003;107:2109.

- [109] Yan H-b, Li W-z, Zhao H-j, Song L, Zheng B, Zhou P, Liu C. Clinical implication and association between local and systemic levels of interleukin-1beta and interleukin-10 in patients with coronary artery disease. *Zhonghua xin xue guan bing za zhi* 2011;39:142.
- [110] Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: So far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:399.
- [111] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin MY, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta-1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693.
- [112] Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S. Transforming growth factor-beta-1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:770.
- [113] Kulkarni AB, Ward JM, Yaswen L, Mackall CL, Bauer SR, Huh CG, Gress RE, Karlsson S. Transforming growth-factor-beta-1 null mice - an animal-model for inflammatory disorders. *American Journal of Pathology* 1995;146:264.
- [114] Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circulation Research* 2001;89:930.
- [115] Lutgens E, Daemen M. Transforming growth factor-beta - A local or systemic mediator of plaque stability? *Circulation Research* 2001;89:853.
- [116] Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, Daemen M. Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22:975.
- [117] 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.
- [118] Robertson AKL, Rudling M, Zhou XH, Gorellk L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2003;112:1342.
- [119] Hansson G, Robertson AKL. TGF-beta in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2004;24:E137.

[120] Grainger DJ, Kemp BR, Metcalfe JC, Liu AC, Lawn RM, Williams NR, Grace AA, Schofield PM, Chauhan A. The serum concentration of active transforming growth-factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nature Medicine* 1995;1:74.

[121] Mor A, Luboshits G, Planer D, Keren G, George J. Altered status of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in patients with acute coronary syndromes. *European Heart Journal* 2006;27:2530.

[122] Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, Kanno Y, Spalding C, Elloumi HZ, Paulson ML, Davis J, Hsu A, Asher AI, O'Shea J, Holland SM, Paul WE, Douek DC. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature* 2008;452:773.

[123] Kisand K, Wolff ASB, Podkrajsek KT, Tserel L, Link M, Kisand KV, Ersvaer E, Perheentupa J, Erichsen MM, Bratanic N, Meloni A, Cetani F, Perniola R, Ergun-Longmire B, Maclaren N, Krohn KJE, Pura M, Schalke B, Stroebel P, Leite MI, Battelino T, Husebye ES, Peterson P, Willcox N, Meager A. Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:299.

[124] Puel A, Doeffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenas-Morales G, Picard C, Cobat A, Ouachee-Chardin M, Toulon A, Bustamante J, Al-Muhsen S, Al-Owain M, Arkwright PD, Costigan C, McConnell V, Cant AJ, Abinun M, Polak M, Bougneres P-F, Kumararatne D, Marodi L, Nahum A, Roifman C, Blanche S, Fischer A, Bodemer C, Abel L, Lilic D, Casanova J-L. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:291.

[125] Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Mechanisms of Disease: Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. *New England Journal of Medicine* 2009;361:888.

[126] Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467.

[127] McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, Cua DJ. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nature Immunology* 2007;8:1390.

[128] Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:2715.

[129] O'Connor W, Jr., Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology* 2009;10:603.

- [130] Ke Y, Liu K, Huang G-Q, Cui Y, Kaplan HJ, Shao H, Sun D. Anti-Inflammatory Role of IL-17 in Experimental Autoimmune Uveitis. *Journal of Immunology* 2009;182:3183.
- [131] Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo S-FL, Ranjbaran H, Gallo A, Sokol SI, Pfau S, Pober JS, Tellides G. 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;119:1424.
- [132] Song L, Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;177:43.
- [133] Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jaeger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484.
- [134] van Es T, van Puijvelde GHM, Ramos OH, Segers FME, Joosten LA, van den Berg WB, Michon IM, de Vos P, van Berkel TJC, Kuiper J. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2009;388:261.
- [135] Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, Celik S, Lasitschka F, Wang Y, Boeckler D, Katus HA, Dengler TJ. Inhibition of IL-17A Attenuates Atherosclerotic Lesion Development in ApoE-Deficient Mice. *Journal of Immunology* 2009;183:8167.
- [136] Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2011;106.
- [137] Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. Adaptive T cell immune responses and atherogenesis. *Current Opinion in Pharmacology* 2010;10:197.
- [138] 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. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:2067.
- [139] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868.
- [140] Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KEJ, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Reikhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to

vulnerable patient - A call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* 2003;108:1772.

[141] Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KEJ, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Priori SG, Rekhater MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient - A call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 2003;108:1664.

[142] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death - A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20:1262.

[143] Boyle JJ, Bowyer DE, Weissberg PL, Bennett MR. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:1402.

[144] Schrijvers DM, De Meyer GRY, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25:1256.

[145] Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simonmorrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth-muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular-matrix digestion. *Circulation Research* 1994;75:181.

[146] Lee E, Grodzinsky AJ, Libby P, Clinton SK, Lark MW, Lee RT. Human vascular smooth-muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:2284.

[147] Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Current Opinion in Hematology* 2007;14:55.

[148] Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005;111:3481.

[149] Dong L, Kerwin WS, Ferguson MS, Li R, Wang J, Chen H, Canton G, Hatsukami TS, Yuan C. Cardiovascular magnetic resonance in carotid atherosclerotic disease. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 2009;11.

- [150] Barker SGE, Talbert A, Cottam S, Baskerville PA, Martin JF. Arterial intimal hyperplasia after occlusion of the adventitial vasa vasorum in the pig. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;13:70.
- [151] Vink A, Pasterkamp G, Poppen M, Schoneveld AH, de Kleijn DPV, Roholl PJM, Fontijn J, Plomp S, Borst C. The adventitia of atherosclerotic coronary arteries frequently contains *Chlamydia pneumoniae*. *Atherosclerosis* 2001;157:117.
- [152] Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi? *Thrombosis and Haemostasis* 2007;97:873.
- [153] de Boer OJ, van der Wal AC, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovascular Research* 1999;41:443.
- [154] Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, McKenna C, Holmes DR, Schwartz RS, Lerman A. Enhanced coronary vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:1551.
- [155] Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR, Richardson DM, Ritman EL, Lerman A. Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovascular Research* 2001;51:762.
- [156] Herrmann J, Samee S, Chade A, Porcel MR, Lerman LO, Lerman A. Differential effect of experimental hypertension and hypercholesterolemia on adventitial remodeling. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25:447.
- [157] Gonzalez MC, Arribas SM, Molero F, Fernandez-Alfonso MS. Effect of removal of adventitia on vascular smooth muscle contraction and relaxation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001;280:H2876.
- [158] Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation* 1999;99:361.
- [159] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture - Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2005;25:2054.
- [160] Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, van Middelaar BJ, Sluijter JPG, Smeets MB, Quax PHA, Lim SK, Borst C, Pasterkamp G, de Kleijn DPV. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2002;106:1985.
- [161] Higuchi ML, Gutierrez PS, Bezerra HG, Palomino SA, Aiello VD, Silvestre JML, Libby P, Ramires JAF. Comparison between adventitial and intimal inflammation of ruptured

and nonruptured atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 2002;79:20.

[162] Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: Implications in vascular complications. *Current Molecular Medicine* 2006;6:501.

[163] Aubineau P. Role of adventitial innervation in establishing and maintaining the structural and functional-properties of the artery wall - effects in old-age. *Annales De Cardiologie Et D Angeiologie* 1991;40:285.

[164] Lee PY, Yun AJ, Bazar KA. Conditions of aging as manifestations of sympathetic bias unmasked by loss of parasympathetic function. *Medical Hypotheses* 2004;62:868.

[165] Yun AJ, Lee PY, Bazar KA. Can thromboembolism be the result, rather than the inciting cause, of acute vascular events such as stroke, pulmonary embolism, mesenteric ischemia, and venous thrombosis?: a maladaptation of the prehistoric trauma response. *Medical Hypotheses* 2005;64:706.

[166] Bot I, de Jager SCA, Zerneck A, Lindstedt KA, van Berkel TJC, Weber C, Biessen EAL. Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2007;115:2516.

[167] Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:1273.

[168] Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu S-N, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:2073.

[169] Wick G, Romen M, Amberger A, Metzler B, Mayr M, Falkensammer G, Xu Q. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *Faseb Journal* 1997;11:1199.

[170] Graebner R, Loetzer K, Doepping S, Hildner M, Radke D, Beer M, Spanbroek R, Lippert B, Reardon CA, Getz GS, Fu Y-X, Hehlgans T, Mebius RE, van der Wall M, Kruspe D, Englert C, Lovas A, Hu D, Randolph GJ, Weih F, Habenicht AJR. Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE(-/-) mice. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:233.

[171] Bobryshev YV, Lord RSA. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis* 2001;154:15.

[172] Houtkamp MA, de Boer OJ, van der Loos CM, van der Wal AC, Becker AE. Adventitial infiltrates associated with advanced atherosclerotic plaques: structural

- organization suggests generation of local humoral immune responses. *Journal of Pathology* 2001;193:263.
- [173] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233.
- [174] Hansson GK. Mechanisms of disease - Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 2005;352:1685.
- [175] Thaunat O, Patey N, Morelon E, Michel J-B, Nicoletti A. Lymphoid neogenesis in chronic rejection: the murderer is in the house. *Current Opinion in Immunology* 2006;18:576.
- [176] Doran AC, Lipinski MJ, Oldham SN, Garmey JC, Campbell KA, Skaflen MD, Cutchins A, Lee DJ, Glover DK, Kelly KA, Galkina EV, Ley K, Witztum JL, Tsimikas S, Bender TP, McNamara CA. B-Cell Aortic Homing and Atheroprotection Depend on Id3. *Circulation Research* 2012;110:E1.
- [177] Zhou X, Hansson GK. Detection of B cells and proinflammatory cytokines in atherosclerotic plaques of hypercholesterolaemic apolipoprotein E knockout mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 1999;50:25.
- [178] Munro JM, Vanderwalt JD, Munro CS, Chalmers JAC, Cox EL. AN Immunohistochemical analysis of human aortic fatty streaks. *Human Pathology* 1987;18:375.
- [179] Aubry MC, Riehle DL, Edwards WD, Maradit-Kremers H, Roger VL, Sebo TJ, Gabriel SE. B-lymphocytes in plaque and adventitia of coronary arteries in two patients with rheumatoid arthritis and coronary atherosclerosis - Preliminary observations. *Cardiovascular Pathology* 2004;13:233.
- [180] Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic-aneurysms - Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *American Journal of Pathology* 1990;137:1199.
- [181] Beckman EN. Plasma-cell infiltrates in atherosclerotic abdominal aortic-aneurysms. *American Journal of Clinical Pathology* 1986;85:21.
- [182] Parums DV, Dunn DC, Dixon AK, Mitchinson MJ. Characterization of inflammatory cells in a patient with chronic periaortitis. *The American journal of cardiovascular pathology* 1990;3:121.
- [183] Schwartz CJ, Mitchell JR. Cellular infiltration of human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation* 1962;26:73.
- [184] Parums DV, Chadwick DR, Mitchinson MJ. The localization of immunoglobulin in chronic periaortitis. *Atherosclerosis* 1986;61:117.

- [185] Pasquinelli G, Preda P, Gargiulo M, Vici M, Cenacchi G, Stella A, Daddato M, Martinelli GN, Pileri S. An immunohistochemical analysis study of inflammatory badominal aortic-aneurysms. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 1993;25:103.
- [186] Katsuda S, Boyd HC, Fligner C, Ross R, Gown AM. Human atherosclerosis .3. Immunocytochemical analysis of the cell composition of lesions of young-adults. *American Journal of Pathology* 1992;140:907.
- [187] Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *American Journal of Pathology* 2000;156:7.
- [188] Link A, Hardie DL, Favre S, Britschgi MR, Adams DH, Sixt M, Cyster JG, Buckley CD, Luther SA. Association of T-Zone Reticular Networks and Conduits with Ectopic Lymphoid Tissues in Mice and Humans. *American Journal of Pathology* 2011;178:1662.
- [189] Burioni R, Canducci F, Saita D, Perotti M, Mancini N, De Marco D, Clementi N, Chieffo A, Denaro M, Cianflone D, Manfredi AA, Colombo A, Maseri A, Clementi M. Antigen-Driven Evolution of B Lymphocytes in Coronary Atherosclerotic Plaques. *Journal of Immunology* 2009;183:2537.
- [190] Liossis S-NC, Sfikakis PP. Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: Potential effects on T cells. *Clinical Immunology* 2008;127:280.
- [191] DiLillo DJ, Horikawa M, Tedder TF. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunologic Research* 2011;49:281.
- [192] Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T-cells, macrophages, and smooth-muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;6:131.
- [193] Sohma Y, Sasano H, Shiga R, Saeki S, Suzuki T, Nagura H, Nose M, Yamamoto T. Accumulation of plasma-cells in atherosclerotic lesions of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:4937.
- [194] Bobryshev YV, Lord RSA. Co-accumulation of dendritic cells and natural killer T cells within rupture-prone regions in human atherosclerotic plaques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005;53:781.
- [195] Pereira IA, Borba EF. The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Swiss Medical Weekly* 2008;138:534.
- [196] Major AS, Fazio S, Linton MF. B-Lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002;22:1892.

- [197] Ait-Oufella H, Herbin O, Bouaziz J-D, Binder CJ, Uyttenhove C, Laurans L, Taleb S, Van Vre E, Esposito B, Vilar J, Sirvent J, Van Snick J, Tedgui A, Tedder TF, Mallat Z. B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:1579.
- [198] Kyaw T, Tay C, Khan A, Dumouchel V, Cao A, To K, Kehry M, Dunn R, Agrotis A, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *Journal of Immunology* 2010;185:4410.
- [199] Lahoute C, Herbin O, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nature Reviews Cardiology* 2011;8:348.
- [200] Doran AC, Lehtinen AB, Meller N, Lipinski MJ, Slayton RP, Oldham SN, Skafien MD, Yeboah J, Rich SS, Bowden DW, McNamara CA. Id3 Is a Novel Atheroprotective Factor Containing a Functionally Significant Single-Nucleotide Polymorphism Associated With Intima-Media Thickness in Humans. *Circulation Research* 2010;106:1303.
- [201] Allan LL, Hoefl K, Zheng D-J, Chung BK, Kozak FK, Tan R, van den Elzen P. Apolipoprotein-mediated lipid antigen presentation in B cells provides a pathway for innate help by NKT cells. *Blood* 2009;114:2411.
- [202] Allan LL, Stax AM, Zheng D-J, Chung BK, Kozak FK, Tan R, van den Elzen P. CD1d and CD1c Expression in Human B Cells Is Regulated by Activation and Retinoic Acid Receptor Signaling. *Journal of Immunology* 2011;186:5261.
- [203] Ferencik M, Stvrtinova V, Hulin I. Defects in regulation of local immune responses resulting in atherosclerosis. *Clinical & developmental immunology* 2005;12:225.
- [204] Wood D, DeBacker G, Graham I, PooleWilson P, Pyorala K, Shepherd J, Zanchetti A, Haman P, Linhartova K, Simon J, Hrnecarek M, Lupinek P, Marek T, Kempainen A, Koukkunen H, Lehto S, Lehto R, Danet S, Domaniewicz R, Lemaire B, Lenoir M, Montaye M, Amouyel P, Broxtermann U, Heimbach M, Liese A, Keil U, Enbergs A, Breithardt G, Scheld HH, KleineKatthofer P, Borbas S, Podmaniczky M, Ostor E, Janosi A, Bradak A, Kenez AB, Leprotti C, Ambrosio GB, Vanuzzo D, Pilotto L, Stritoni P, Pedrocco A, Perissinotto F, Zardin P, Gallo A, Rossi L, Post F, Deckers JW, deBoer A, Veerhoek MR, Stockx E, vandeBerg R, Remme WJ, vanVliet R, Marn K, Salapure V, Turk J, Paluzie G, Perez I, Puig T, Varas C, Sans S, deLuna AB, Lopez FN, Monras P, Bowker T, Ingham J, McLennan N, Schofield B, DeBacquer D, James D, Deckers J, Gutzwiller F. A European Society of Cardiology survey of secondary prevention of coronary heart disease: Principal results. *European Heart Journal* 1997;18:1569.
- [205] Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *Jama-Journal of the American Medical Association* 2003;290:891.

- [206] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:1876.
- [207] Virella G, Lopes-Virella MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis* 2008;200:239.
- [208] Hermansson A, Ketelhuth DFJ, Strodtzoff D, Wurm M, Hansson EM, Nicoletti A, Paulsson-Berne G, Hansson GK. Inhibition of T cell response to native low-density lipoprotein reduces atherosclerosis. *Journal of Experimental Medicine* 2010;207:1081.
- [209] Miller YI, Choi S-H, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que X, Montano E, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity. *Circulation Research* 2011;108:235.
- [210] Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T-lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low-density-lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:3893.
- [211] Caligiuri G, Nicoletti A, Zhou XH, Tornberg I, Hansson GK. Effects of sex and age on atherosclerosis and autoimmunity in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 1999;145:301.
- [212] Nicoletti A, Paulsson G, Caligiuri G, Zhou XH, Hansson GK. Induction of neonatal tolerance to oxidized lipoprotein reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Molecular Medicine* 2000;6:283.
- [213] Costacou T, Lopes-Virella MF, Zgibor JC, Virella G, Otvos J, Walsh M, Orchard TJ. Markers of endothelial dysfunction in the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications study. *Journal of Diabetes and Its Complications* 2005;19:183.
- [214] Yishak AA, Costacou T, Virella G, Zgibor J, Fried L, Walsh M, Evans RW, Lopes-Virella M, Kagan VE, Otvos J, Orchard TJ. Novel predictors of overt nephropathy in subjects with type 1 diabetes. A nested case control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications cohort. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006;21:93.
- [215] Tsimikas S, Brilakis ES, Lennon RJ, Miller ER, Witztum JL, McConnell JP, Kornman KS, Berger PB. Relationship of IgG and IgM autoantibodies to oxidized low density lipoprotein with coronary artery disease and cardiovascular events. *Journal of Lipid Research* 2007;48:425.
- [216] Klimov AN, Denisenko AD, Vinogradov AG, Nagornev VA, Pivovarova YI, Sitnikova OD, Pleskov VM. Accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with human lipoprotein-antibody autoimmune complex. *Atherosclerosis* 1988;74:41.

- [217] Mironova M, Virella G, VirellaLowell I, LopesVirella MF. Anti-modified LDL antibodies and LDL-containing immune complexes in IDDM patients and healthy controls. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1997;85:73.
- [218] Mironova MA, Klein RL, Virella GT, Lopes-Virella MF. Anti-modified LDL antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2000;49:1033.
- [219] Virella G, Munoz JF, Galbraith GMP, Gissinger C, Chassereau C, Lopesvirella MF. Activation of human monocyte-derived macrophages by immune-complexes containing low-density-lipoprotein. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1995;75:179.
- [220] Mironova M, Virella G, LopesVirella MF. Isolation and characterization of human autoantibodies against oxidized LDL. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1996;16:222.
- [221] Virella G, Thorpe SR, Alderson NL, Stephan EM, Atchley D, Wagner F, Lopes-Virella MF, Grp DER. Autoimmune response to advanced glycosylation end-products of human LDL. *Journal of Lipid Research* 2003;44:487.
- [222] Palinski W, Tangirala RK, Miller E, Young SG, Witztum JL. Increased autoantibody titers against epitopes of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice with increased atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1995;15:1569.
- [223] Zhou XH, Caligiuri G, Hamsten A, Lefvert AK, Hansson GK. LDL immunization induces T-cell-dependent antibody formation and protection against atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:108.
- [224] Virella G, Thorpe SR, Alderson NL, Derrick MB, Chassereau C, Rhett JM, Lopes-Virella ME. Definition of the immunogenic forms of modified human LDL recognized by human autoantibodies and by rabbit hyperimmune antibodies. *Journal of Lipid Research* 2004;45:1859.
- [225] Tsimikas S, Palinski W, Witztum JL. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with arterial accumulation and depletion of oxidized LDL in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:95.
- [226] van Wanrooij EJA, van Puijvelde GHM, de Vos P, Yagita H, van Berkel TJC, Kuiper J. Interruption of the Tnfrsf4/Tnfsf4 (OX40/OX40L) pathway attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2007;27:204.
- [227] Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Lopez-Franco O, Suzuki Y, Gallego-Delgado J, Sanjuan G, Lazaro A, Lopez-Parra V, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fc gamma receptor deficiency confers protection against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation Research* 2006;99:1188.

- [228] Speidl WS, Kastl SP, Huber K, Wojta J. Complement in atherosclerosis: friend or foe? *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2011;9:428.
- [229] Huang Y, Jaffa A, Koskinen S, Takei A, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL-containing immune complexes induce Fc gamma receptor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation in THP-1 macrophages. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:1600.
- [230] Mendez-Fernandez YV, Stevenson BG, Diehl CJ, Braun NA, Wade NS, Covarrubias R, van Leuven S, Witztum JL, Major AS. The inhibitory Fc gamma RIIb modulates the inflammatory response and influences atherosclerosis in male apoE(-/-) mice. *Atherosclerosis* 2011;214:73.
- [231] Wang J, Cheng X, Xiang M-X, Alanne-Kinnunen M, Wang J-A, Chen H, He A, Sun X, Lin Y, Tang T-T, Tu X, Sjoeborg S, Sukhova GK, Liao Y-H, Conrad DH, Yu L, Kawakami T, Kovanen PT, Libby P, Shi G-P. IgE stimulates human and mouse arterial cell apoptosis and cytokine expression and promotes atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Journal of Clinical Investigation* 2011;121:3564.
- [232] Welch WJ. Mammalian stress response - cell physiology, structure-function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological Reviews* 1992;72:1063.
- [233] Kiessling R, Gronberg A, Ivanyi J, Soderstrom K, Ferm M, Kleinau S, Nilsson E, Klareskog L. Role of HSP60 during autoimmune and bacterial inflammation. *Immunological Reviews* 1991;121:91.
- [234] Jones DB, Coulson AFW, Duff GW. Sequence homologies between HSP60 and autoantigens. *Immunology Today* 1993;14:115.
- [235] Res PCM, Breedveld FC, Vanembden JDA, Schaar CG, Vaneden W, Cohen IR, Devries RRP. Synovial-fluid T-cell reactivity against 65 KD heat-shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. *Lancet* 1988;2:478.
- [236] Vaneden W, Thole JER, Vanderzee R, Noordzij A, Vanembden JDA, Hensen EJ, Cohen IR. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by lymphocytes-T in adjuvant arthritis. *Nature* 1988;331:171.
- [237] Mayr M, Metzler B, Kiechl S, Willeit J, Schett G, Xu QB, Wick G. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae* - Immune reactions to heat shock proteins as a possible link between infection and atherosclerosis. *Circulation* 1999;99:1560.
- [238] Frostegard J, Kjellman B, Gidlund M, Andersson B, Jindal S, Kiessling R. Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1996;121:93.

- [239] George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shaish A, Kopolovic J, Wick G, Harats D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J mice by immunization with heat shock protein-65. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:505.
- [240] Frostegard J, Lemne C, Andersson B, vanderZee R, Kiessling R, deFaire U. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with borderline hypertension. *Hypertension* 1997;29:40.
- [241] Pockley AG, Wu R, Lemne C, Kiessling R, de Faire U, Frostegard J. Circulating heat shock protein 60 is associated with early cardiovascular disease. *Hypertension* 2000;36:303.
- [242] Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Progress in Lipid Research* 2006;45:466.
- [243] Shoenfeld Y, Harats D, George J. Atherosclerosis and the antiphospholipid syndrome: A link unravelled? *Lupus* 1998;7:S140.
- [244] George J, Afek A, Gilburd B, Blank M, Levy Y, Aron-Maor A, Levkovitz H, Shaish A, Goldberg I, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y. Induction of early atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice immunized with beta(2)-glycoprotein I. *Circulation* 1998;98:1108.
- [245] George J, Harats D, Gilburd B, Afek A, Shaish A, Kopolovic J, Shoenfeld Y. Adoptive transfer of beta(2)-glycoprotein I-reactive lymphocytes enhances early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 2000;102:1822.
- [246] Pratico D, Tangirala RK, Horkko S, Witztum JL, Palinski W, FitzGerald GA. Circulating autoantibodies to oxidized cardiolipin correlate with isoprostane F-2 alpha-VI levels and the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice: modulation by vitamin E. *Blood* 2001;97:459.
- [247] Shaw PX, Horkko S, Chang MK, Curtiss LK, Palinski W, Silverman GJ, Witztum JL. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *Journal of Clinical Investigation* 2000;105:1731.
- [248] Binder CJ, Silverman GJ. Natural antibodies and the autoimmunity of atherosclerosis. *Springer Seminars in Immunopathology* 2005;26:385.
- [249] Binder CJ, Horkko S, Dewan A, Chang MK, Kieu EP, Goodyear CS, Shaw PX, Palinski W, Witztum JL, Silverman GJ. Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between *Streptococcus pneumoniae* and oxidized LDL. *Nature Medicine* 2003;9:736.

[250] Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Boullier A, Hartvigsen K, Horkko S, Miller YI, Woelkers DA, Corr M, Witztum JL. The role of natural antibodies in atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 2005;46:1353.

[251] Virella G, Koskinen S, Krings G, Onorato JM, Thorpe SR, Lopes-Virella M. Immunochemical characterization of purified human oxidized low-density lipoprotein antibodies. *Clinical Immunology* 2000;95:135.

[252] Damoiseaux J, Jeyasekharan AD, Theunissen R, Tervaert JWC. Cross-reactivity of IgM and IgG anticardiolipin antibodies with oxidized-low density lipoproteins. *Autoimmunity: Concepts and Diagnosis at the Cutting Edge* 2005;1050:163.

[253] Sherer Y, Gerli R, Vaudo G, Schillaci G, Gilburd B, Giordano A, Bocci EB, Allegrucci R, Marchesi S, Mannarino E, Shoenfeld Y. Prevalence of antiphospholipid and antioxidized low-density lipoprotein antibodies in rheumatoid arthritis. *Autoimmune Diseases and Treatment: Organ-Specific and Systemic Disorders* 2005;1051:299.

[254] Saikku P, Mattila K, Nieminen MS, Huttunen JK, Leinonen M, Ekman MR, Makela PH, Valtonen V. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, Twar, with chronic coronary heart-disease and acute myocardial-infarction. *Lancet* 1988;2:983.

[255] Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia-Pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993;13:1501.

[256] Saikku P. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis - an update. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 1997:53.

[257] Mosorin M, Surcel HM, Laurila A, Lehtinen M, Karttunen R, Juvonen J, Paavonen J, Morrison RP, Saikku P, Juvonen T. Detection of Chlamydia pneumoniae-reactive T lymphocytes in human atherosclerotic plaques of carotid artery. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2000;20:1061.

[258] Benaglio M, Munari F, Ciervo A, Amedei A, Paccani SR, Mancini F, Ferrari M, Della Bella C, Ulivi C, D'Elis S, Baldari CT, Prisco D, de Bernard M, D'Elis MM. Chlamydia pneumoniae phospholipase D (CpPLD) drives Th17 inflammation in human atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:1222.

[259] Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, Cummings P, Patton DL, Schulhoff N, Shani J, Frankel R, Penney K, Quinn TC, Hammerschlag MR, Schachter J. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *Journal of Infectious Diseases* 1996;173:957.

[260] Aalto-Setälä K, Laitinen K, Erkkilä L, Leinonen M, Jauhiainen M, Ehnholm C, Tamminen M, Puolakkainen M, Penttilä I, Saikku P. Chlamydia pneumoniae does not

increase atherosclerosis in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:578.

[261] Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Backhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:4592.

[262] Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang WX, Yano JA, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:10679.

[263] Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *Journal of Clinical Investigation* 2005;115:3149.

[264] Wright SD, Burton C, Hernandez M, Hassing H, Montenegro J, Mundt S, Patel S, Card DJ, Hermanowski-Vosatka A, Bergstrom JD, Sparrow CP, Detmers PA, Chao YS. Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191:1437.

[265] Hartvigsen K, Chou M-Y, Hansen LF, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL. The role of innate immunity in atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 2009;50:S388.

[266] Montes R, Hurtado V, Alonso A, Foco L, Zonzin P, Mannucci PM, Hermida A. Autoantibodies against the endothelial receptor of protein C are associated with acute myocardial infarction in young women. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005;3:1454.

[267] Elsheikh E, Sylven C, Henareh L. Anti-endothelial cell antibodies are increased in patients with previous myocardial infarction. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 2010;44:255.

[268] Pham T, Gregg CJ, Karp F, Chow R, Padler-Karavani V, Cao H, Chen X, Witztum JL, Varki NM, Varki A. Evidence for a novel human-specific xeno-auto-antibody response against vascular endothelium. *Blood* 2009;114:5225.

[269] Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent Advances on the Role of Cytokines in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2011;31:969.

[270] Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial-cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990;344:254.

[271] Hamilton JA, Anderson GP. GM-CSF biology. *Growth Factors* 2004;22:225.

- [272] Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2000;11:503.
- [273] Shaposhnik Z, Wang X, Weinstein M, Bennett BJ, Lusis AJ. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor regulates dendritic cell content of atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2007;27:621.
- [274] Zhu S-N, Chen M, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:2141.
- [275] Ditiatkovski M, Toh B-H, Bobik A. GM-CSF deficiency reduces macrophage PPAR-gamma expression and aggravates atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2006;26:2337.
- [276] Brocheriou I, Maouche S, Durand H, Braunersreuther V, Le Naour G, Gratchev A, Koskas F, Mach F, Kzhyshkowska J, Ninio E. Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011;214:316.
- [277] Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology* 2007;37:14.
- [278] Sonderegger I, Iezzi G, Maier R, Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *Journal of Experimental Medicine* 2008;205:2281.
- [279] Ishibashi T, Yokoyama K, Shindo J, Hamazaki Y, Endo Y, Sato T, Takahashi S, Kawarabayasi Y, Shiomi M, Yamamoto T, Maruyama Y. Potent cholesterol-lowering effect by human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rabbits - possible implications of enhancement of macrophage functions and an increase in messenger-RNA for VLDL receptor. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994;14:1534.
- [280] Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *European Heart Journal* 2000;21:1574.
- [281] Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 1996;94:874.
- [282] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767.

- [283] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research* 2008;79:360.
- [284] Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1999;19:2364.
- [285] Hashizume M, Mihara M. Atherogenic effects of TNF-alpha and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors. *Cytokine* 2012;58:424.
- [286] Van Lenten BJ, Wagner AC, Navab M, Fogelman AM. Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoJ but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:1923.
- [287] Elhage R, Clamens S, Besnard S, Mallat Z, Tedgui A, Arnal JF, Maret A, Bayard F. Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17 beta-estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2001;156:315.
- [288] Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJF, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen M, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:3493.
- [289] Frisdal E, Lesnik P, Olivier M, Robillard P, Chapman MJ, Huby T, Guerin M, Le Goff W. Interleukin-6 Protects Human Macrophages from Cellular Cholesterol Accumulation and Attenuates the Proinflammatory Response. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:30926.
- [290] Peters A, Lee Y, Kuchroo VK. The many faces of Th17 cells. *Current Opinion in Immunology* 2011;23:702.
- [291] Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2012;209:1001.
- [292] Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, Browning JL. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Current topics in microbiology and immunology* 1995;198:175.
- [293] Fu YX, Huang GM, Wang Y, Chaplin DD. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin alpha-dependent fashion. *Journal of Experimental Medicine* 1998;187:1009.
- [294] Lorenz RG, Chaplin DD, McDonald KG, McDonough JS, Newderry RD. Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function. *Journal of Immunology* 2003;170:5475.

- [295] Kumaraguru U, Davis IA, Deshpande S, Tevethia SS, Rouse BT. Lymphotoxin alpha(-/-) mice develop functionally impaired CD8(+) T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system. *Journal of Immunology* 2001;166:1066.
- [296] Tumanov AV, Kuprash DV, Mach JA, Nedospasov SA, Chervonsky AV. Lymphotoxin and TNF produced by B cells are dispensable for maintenance of the follicle-associated epithelium but are required for development of lymphoid follicles in the Peyer's patches. *Journal of Immunology* 2004;173:86.
- [297] Schreyer SA, Vick CM, LeBoeuf RC. Loss of lymphotoxin-alpha but not tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in mice. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:12364.
- [298] Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor-necrosis-factor gene-expression in human vascular intimal smooth-muscle cells detected by in situ hybridization. *American Journal of Pathology* 1990;137:503.
- [299] Barath P, Cao J, Forrester JS. Low-density-lipoprotein activates monocytes to express tumor-necrosis-factor. *Febs Letters* 1990;277:180.
- [300] Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *American Journal of Cardiology* 1990;65:297.
- [301] Elhage R, Maret A, Pieraggi MT, Thiers JC, Arnal JF, Bayard F. Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1998;97:242.
- [302] Schreyer SA, Peschon JJ, LeBoeuf RC. Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:26174.
- [303] Menard LC, Minns LA, Darche S, Mielcarz DW, Foureau DM, Roos D, Dzierszynski F, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. *Journal of Immunology* 2007;179:4857.
- [304] Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:9238.
- [305] Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chiroso G, Lobb R. Direct expression cloning of vascular cell-adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that's binds to lymphocytes. *Cell* 1989;59:1203.

- [306] Waldman WJ, Knight DA. Cytokine-mediated induction of endothelial adhesion molecule and histocompatibility leukocyte antigen expression by cytomegalovirus-activated T cells. *American Journal of Pathology* 1996;148:105.
- [307] Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial-cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *American Journal of Pathology* 1990;136:1229.
- [308] Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. Endotoxin and tumor necrosis-factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial-cells. *American Journal of Pathology* 1986;124:179.
- [309] Palombella VJ, Mendelsohn J, Vilcek J. Mitogenic action of tumor necrosis factor in human-fibroblasts - interaction with epidermal growth-factor and platelet-derived growth-factor. *Journal of Cellular Physiology* 1988;135:23.
- [310] Stemme S, Jonasson L, Holm J, Hansson GK. Immunological control of vascular cell-growth in arterial response to injury and atherosclerosis. *Transplantation Proceedings* 1989;21:3697.
- [311] Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor-necrosis-factor-alpha. *Nature* 1987;329:630.
- [312] Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M. Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2005;180:11.
- [313] Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang R, Bond MG, de Faire U, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men. *European Heart Journal* 2002;23:376.
- [314] Elkind MS, Cheng JF, Boden-Albala B, Rundek T, Thomas J, Chen H, Rabbani LE, Sacco RL. Tumor necrosis factor receptor levels are associated with carotid atherosclerosis. *Stroke* 2002;33:31.
- [315] Lossos IS, Tibshirani R, Narasimhan B, Levy R. The inference of antigen selection on Ig genes. *Journal of Immunology* 2000;165:5122.
- [316] Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575.
- [317] Oettinger MA, Schatz DG, Gorka C, Baltimore D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 1990;248:1517.
- [318] Chen K, Cerutti A. The function and regulation of immunoglobulin D. *Current Opinion in Immunology* 2011;23.

- [319] Sakano H, Huppi K, Heinrich G, Tonegawa S. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature* 1979;280:288.
- [320] Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 1989;59:1035.
- [321] Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. An immunoglobulin heavy-chain variable region gene is generated from 3 segments of DNA - VH, D and JH. *Cell* 1980;19:981.
- [322] VanGent DC, McBlane JF, Ramsden DA, Sadofsky MJ, Hesse JE, Gellert M. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system by RAG1 and RAG2 proteins. *Molecular Analysis of DNA Rearrangements in the Immune System* 1996;217:1.
- [323] vanGent DC, Hiom K, Paull TT, Gellert M. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *Embo Journal* 1997;16:2665.
- [324] Yannone SM, Khan IS, Zhou R-Z, Zhou T, Valerie K, Povirk LF. Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by Artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Research* 2008;36:3354.
- [325] Niewolik D, Pannicke U, Lu H, Ma Y, Wang L-CV, Kulesza P, Zandi E, Lieber MR, Schwarz K. DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:33900.
- [326] Gilfillan S, Benoist C, Mathis D. Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: Adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunological Reviews* 1995;148:201.
- [327] Thai TH, Purugganan MM, Roth DB, Kearney JF. Distinct and opposite diversifying activities of terminal transferase splice variants. *Nature Immunology* 2002;3:457.
- [328] Thai TH, Kearney JF. Isoforms of terminal deoxynucleotidyltransferase: Developmental aspects and function. *Advances in Immunology*, Vol 86 2005;86:113.
- [329] Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem-cells. *Science* 1988;241:58.
- [330] Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 1997;91:661.
- [331] Galy A, Travis M, Cen DZ, Chen B. Human T-cells, B-cells, Natural-killer, and dendritic cells arise from a common bone-marrow progenitor-cell subset. *Immunity* 1995;3:459.

- [332] LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570.
- [333] Hardy RR, Carmack CE, Shinton SA, Kemp JD, Hayakawa K. Resolution and characterization of Pro-B and Pre-Pro-B cell stages in normal mouse bone-marrow. *Journal of Experimental Medicine* 1991;173:1213.
- [334] Rolink A, Haasner D, Melchers F, Andersson J. The surrogate light chain in mouse B-cell development. *International reviews of immunology* 1996;13:341.
- [335] Li YS, Wasserman R, Hayakawa K, Hardy RR. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* 1996;5:527.
- [336] Alessandrini A, Desiderio SV. Coordination of immunoglobulin DJH transcription and and D to JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Molecular and Cellular Biology* 1991;11:2096.
- [337] Schlissel MS, Corcoran LM, Baltimore D. Virus-transformed Pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *Journal of Experimental Medicine* 1991;173:711.
- [338] LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 2000;96:9.
- [339] Nagata K, Nakamura T, Kitamura F, Kuramochi S, Taki S, Campbell KS, Karasuyama H. The Ig alpha/Ig beta heterodimer on mu-negative ProB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 1997;7:559.
- [340] Meffre E, Fougereau M, Argenson JN, Aubaniac JM, Schiff C. Cell surface expression of surrogate light chain (Psi L) in the absence of mu on human pro-B cell lines and normal pro-B cells. *European Journal of Immunology* 1996;26:2172.
- [341] Gong SC, Nussenzweig MC. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 1996;272:411.
- [342] Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D, Venkitaraman AR. Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 1998;391:904.
- [343] Hesslein DGT, Pflugh DL, Chowdhury D, Bothwell ALM, Sen RJ, Schatz DG. Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes & Development* 2003;17:37.
- [344] Schiff C, Bensmana M, Guglielmi P, Milili M, Lefranc MP, Fougereau M. The immunoglobulin-lambda-like gene-cluster (14.1, 16.1, and F-Lambda-1) contains gene(s) selectively expressed in Pre-B cells and is the human counterpart of the mouse lambda-5 gene. *International Immunology* 1990;2:201.

- [345] Rolink A, Melchers F. B-cell development in the mouse. *Immunology Letters* 1996;54:157.
- [346] Mundt C, Licence S, Shimizu T, Melchers F, Martensson IL. Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine* 2001;193:435.
- [347] Kitamura D, Kudo A, Schaal S, Muller W, Melchers F, Rajewsky K. A critical role of lambda-5 protein in B-cell development. *Cell* 1992;69:823.
- [348] Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. A B- cell deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu-chain gene. *Nature* 1991;350:423.
- [349] Grawunder U, Leu TMJ, Schatz DG, Werner A, Rolink AG, Melchers F, Winkler TH. Down regulation of RAG1 and RAG2 gene-expression in PreB cells after functional immunoglobulin heavy-chain rearrangement. *Immunity* 1995;3:601.
- [350] Kitamura D, Rajewsky K. Targeted disruption of mu-chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 1992;356:154.
- [351] Loffert D, Ehlich A, Muller W, Rajewsky K. Surrogate light chain expression is required to establish immunoglobulin heavy chain allelic exclusion during early B cell development. *Immunity* 1996;4:133.
- [352] Tenboekel E, Melchers F, Rolink A. The status of Ig loci rearrangements in single cells from different stages of B-cell development. *International Immunology* 1995;7:1013.
- [353] Rolink A, Grawunder U, Winkler TH, Karasuyama H, Melchers F. IL-2 receptor-alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B-cell development. *International Immunology* 1994;6:1257.
- [354] Meffre E, Casellas R, Nussenzweig MC. Antibody regulation of B cell development. *Nature Immunology* 2000;1:379.
- [355] Radic MZ, Erikson J, Litwin S, Weigert M. B-lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *Journal of Experimental Medicine* 1993;177:1165.
- [356] Tiegs SL, Russell DM, Nemazee D. Receptor editing in self-reactive bone-marrow B-cells. *Journal of Experimental Medicine* 1993;177:1009.
- [357] Dorner T, Foster SJ, Farner NL, Lipsky PE. Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102:688.
- [358] Feuillard J, Raphael M. différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie* 2000;6:345.

- [359] MacLennan ICM, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DMY, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG. Extrafollicular antibody responses. *Immunological Reviews* 2003;194:8.
- [360] Rolink AG, Andersson J, Melchers F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *European Journal of Immunology* 1998;28:3738.
- [361] Carsetti R, Rosado MM, Wardemann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunological Reviews* 2004;197:179.
- [362] Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105:4390.
- [363] Srivastava B, Quinn WJ, Hazard K, Erikson J, Allman D. Characterization of marginal zone B cell precursors. *Journal of Experimental Medicine* 2005;202:1225.
- [364] Suzuki K, Grigorova I, Phan TG, Kelly LM, Cyster JG. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:1485.
- [365] Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist F, de Saint Basile G, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:1166.
- [366] Erickson LD, Durell BG, Vogel LA, O'Connor BP, Cascalho M, Yasui T, Kikutani H, Noelle RJ. Short-circuiting long-lived humoral immunity by the heightened engagement of CD40. *Journal of Clinical Investigation* 2002;109:613.
- [367] Paus D, Phan TG, Chan TD, Gardam S, Basten A, Brink R. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:1081.
- [368] Fagarasan S, Honjo T. T-independent immune response: New aspects of B cell biology. *Science* 2000;290:89.
- [369] Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001;14:617.
- [370] Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology* 2005;5:230.
- [371] Baumgarth N, Tung JW, Herzenberg LA. Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Seminars in Immunopathology* 2005;26:347.

- [372] Manson JJ, Mauri C, Ehrenstein MR. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Seminars in Immunopathology* 2005;26:425.
- [373] Odendahl M, Mei H, Hoyer BF, Jacobi AM, Hansen A, Muehlinghaus G, Berek C, Hiepe F, Manz R, Radbruch A, Dorner T. Generation of migratory antigen-specific plasmablasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005;105:1614.
- [374] Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annual Review of Immunology* 2005;23:367.
- [375] Peng SL. Signaling in B cells via toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology* 2005;17:230.
- [376] Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews* 2000;176:154.
- [377] Janeway CA, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik. *Immunobiologie*. paris, 2003.
- [378] Weintraub A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydrate Research* 2003;338:2539.
- [379] Jeurissen A, Ceuppens JL, Bossuyt X. T lymphocyte dependence of the antibody response to 'T lymphocyte independent type 2' antigens. *Immunology* 2004;111:1.
- [380] Balazs M, Martin F, Zhou T, Kearney JF. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-Independent immune responses. *Immunity* 2002;17:341.
- [381] Pillai S, Cariappa A, Moran ST. Marginal zone B cells. *Annual Review of Immunology* 2005;23:161.
- [382] McHeyzer-Williams MG. B cells as effectors. *Current Opinion in Immunology* 2003;15:354.
- [383] Sagaert X, De Wolf-Peters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunology Letters* 2003;90:179.
- [384] Baumgarth N, Herman OC, Jager GC, Brown L, Herzenberg LA. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:2250.

- [385] Yang Y, Tung JW, Ghosn EEB, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:4542.
- [386] Haas KM, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. B-1a and b-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to S-pneumoniae. *Immunity* 2005;23:7.
- [387] Dono M, Cerruti G, Zupo S. The CD5+B-cell. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004;36:2105.
- [388] Martin F, Kearney JF. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1B cells as part of a "natural immune memory". *Immunological Reviews* 2000;175:70.
- [389] Ferguson AR, Youd ME, Corley RB. Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells. *International Immunology* 2004;16:1411.
- [390] Attanavanich K, Kearney JF. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *Journal of Immunology* 2004;172:803.
- [391] Sonoda KH, Stein-Streilein J. CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *European Journal of Immunology* 2002;32:848.
- [392] Steiniger B, Timphus EM, Jacob R, Barth PJ. CD27(+) B cells in human lymphatic organs: re-evaluating the splenic marginal zone. *Immunology* 2005;116:429.
- [393] Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197:939.
- [394] Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 2004;104:3647.
- [395] Ettinger R, Sims GP, Robbins R, Withers D, Fischer RT, Grammer AC, Kuchen S, Lipsky PE. IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells. *Journal of Immunology* 2007;178:2872.

- [396] Martin F, Chen XJ, Kearney JF. Development of V(H)81X transgene-bearing B cells in fetus and adult: Sites for expansion and deletion in conventional and CD5/B1 cells. *International Immunology* 1997;9:493.
- [397] Lam KP, Rajewsky K. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *Journal of Experimental Medicine* 1999;190:471.
- [398] Watanabe N, Nisitani S, Ikuta K, Suzuki M, Chiba T, Honjo T. Expression levels of B cell surface immunoglobulin regulate efficiency of allelic exclusion and size of autoreactive B-1 cell compartment. *Journal of Experimental Medicine* 1999;190:461.
- [399] Chen XJ, Martin F, Forbush KA, Perlmutter RM, Kearney JF. Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone. *International Immunology* 1997;9:27.
- [400] Arnold LW, Pennell CA, McCray SK, Clarke SH. Development of B-1 cells - segregation of phosphatidyl choline-specific B-cells to the B-1 population occurs after immunoglobulin gene expression. *Journal of Experimental Medicine* 1994;179:1585.
- [401] Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T-cell-independent antigens type-2. *Annual Review of Immunology* 1995;13:655.
- [402] MacLennan ICM. Germinal-centers. *Annual Review of Immunology* 1994;12:117.
- [403] Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM(high)CD21(high) lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *Journal of Immunology* 1999;162:7198.
- [404] Crotty S, Johnston RJ, Schoenberger SP. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature Immunology* 2010;11:114.
- [405] MacLennan ICM, Vinuesa CG. Dendritic cells, BAFF, and APRIL: Innate players in adaptive antibody responses. *Immunity* 2002;17:235.
- [406] Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381:751.
- [407] Cheng H-L, Vuong BQ, Basu U, Franklin A, Schwer B, Astarita J, Phan RT, Datta A, Manis J, Alt FW, Chaudhuri J. Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:2717.
- [408] Phan TG, Gray EE, Cyster JG. The microanatomy of B cell activation. *Current Opinion in Immunology* 2009;21:258.
- [409] Lydyard P, Whelan A, Fanger M. *l'essentiel en immunologie*. Paris, 2002.

- [410] Schitteck B, Rajewsky K. Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 1990;346:749.
- [411] Pascual V, Liu YJ, Magalski A, Debouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in 5 B-cell subsets of human tonsil. *Journal of Experimental Medicine* 1994;180:329.
- [412] Gearhart PJ, Johnson ND, Douglas R, Hood L. IgG antibodies to phosphorycholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. *Nature* 1981;291:29.
- [413] Teng G, Papavasiliou EN. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual Review of Genetics* 2007;41:107.
- [414] Betz AG, Neuberger MS, Milstein C. Discriminating intrinsic and antigen-selected mutational hotspots in immunoglobulin V-genes. *Immunology Today* 1993;14:405.
- [415] Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 2003;422:726.
- [416] Fukita Y, Jacobs H, Rajewsky K. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 1998;9:105.
- [417] Peled JU, Kuang FL, Iglesias-Ussel MD, Roa S, Kalis SL, Goodman ME, Scharff MD. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology* 2008;26:481.
- [418] McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M. Generation of antibody diversity in the immune-response of BALB-C mice to influenza-virus hemagglutinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1984;81:3180.
- [419] Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R, Muramatsu M. AID to overcome the limitations of genomic information. *Nature Immunology* 2005;6:655.
- [420] Neuberger MS, Harris RS, Di Noia J, Petersen-Mahrt SK. Immunity through DNA deamination. *Trends in Biochemical Sciences* 2003;28:305.
- [421] Di Noia J, Neuberger MS. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase. *Nature* 2002;419:43.
- [422] Di Nola JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* 2007;76:1.
- [423] Martin A, Scharff MD. Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:12304.

- [424] Yoshikawa K, Okazaki IM, Eto T, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* 2002;296:2033.
- [425] Padlan EA. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology* 1994;31:169.
- [426] Cory S, Adams JM. Deletions are associated with somatic rearrangement of immunoglobulin heavy-chain genes. *Cell* 1980;19:37.
- [427] Matsuoka M, Yoshida K, Maeda T, Usuda S, Sakano H. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes - Evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 1990;62:135.
- [428] Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, Catalan N, Forveille M, Dufourcq-Lagelouse R, Gennery A, Tezcan I, Ersoy F, Kayserili H, Ugazio AG, Brousse N, Muramatsu M, Notarangelo LD, Kinoshita K, Honjo T, Fischer A, Durandy A. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 2000;102:565.
- [429] Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Signal Transduction and the Coordination of B Lymphocyte Development and Function* 2000;245:127.
- [430] Stavnezer J, Amemiya CT. Evolution of isotype switching. *Seminars in Immunology* 2004;16:257.
- [431] Kett K, Brandtzaeg P, Radl J, Haaijman JJ. Different subclass distribution of IgA-producing cells in human lymphoid organs and various secretory tissues. *Journal of Immunology* 1986;136:3631.
- [432] Islam KB, Nilsson L, Sideras P, Hammarstrom L, Smith CIE. TGF-beta-1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human lymphocytes-B. *International Immunology* 1991;3:1099.
- [433] Shockett P, Stavnezer J. Effect of cytokines on switching to IgA and alpha-germline transcripts in the B-lymphoma I.29 -mu -transforming growth-factor-beta activates transcription of the unrearranged c-alpha-gene. *Journal of Immunology* 1991;147:4374.
- [434] Nilsson L, Islam KB, Olafsson O, Zalcborg I, Samakovlis C, Hammarstrom L, Smith CIE, Sideras P. Structure of TGF-beta-1-induced human immunoglobulin-c-alpha1 and immunoglobulin-c-alpha-2 germline transcripts. *International Immunology* 1991;3:1107.
- [435] Nilsson L, Grant P, Larsson I, Pettersson S, Sideras P. The human I(alpha)1 region contains a TGF-beta-1 responsive enhancer and a putative recombination hotspot. *International Immunology* 1995;7:1191.

- [436] Mills FC, Harindranath N, Mitchell M, Max EE. Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin C alpha genes. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186:845.
- [437] Pan O, Petit-Frere C, Stavnezer J, Hammarstrom L. Regulation of the promoter for human immunoglobulin gamma 3 germline transcription and its interaction with the 3' alpha enhancer. *Faseb Journal* 2000;14:A1044.
- [438] Pan Q, Petit-Frere C, Stavnezer J, Hammarstrom L. Regulation of the promoter for human immunoglobulin gamma 3 germ-line transcription and its interaction with the 3' alpha enhancer. *European Journal of Immunology* 2000;30:1019.
- [439] Purkerson J, Isakson P. A 2-Signal model for regulation of immunoglobulin isotype switching. *Faseb Journal* 1992;6:3245.
- [440] Pan Q, Petit-Frere C, Dai SJ, Huang P, Morton HC, Brandtzaeg P, Hammarstrom L. Regulation of switching and production of IgA in human B cells in donors with duplicated alpha 1 genes. *European Journal of Immunology* 2001;31:3622.
- [441] Lopez Granados E, Porpiglia AS, Hogan MB, Matamoros N, Krasovec S, Pignata C, Smith CIE, Hammarstrom L, Bjorkander J, Belohradsky BH, Casariego GF, Garcia Rodriguez MC, Conley ME. Clinical and molecular analysis of patients with defects in micro heavy chain gene. *The Journal of clinical investigation* 2002;110:1029.
- [442] Pan Q, Matamoros N, Bjorkander J, Conley ME, Hammarstrom L. Lack of IgA in C mu-deficient patients. *Nature Immunology* 2002;3:595.
- [443] Morell A, Skvaril F, Hitzig WH, Barandun S. IgG subclasses - development of serum concentrations in normal infants and children. *Journal of Pediatrics* 1972;80:960.
- [444] Oxelius VA. IgG subclass levels in infancy and childhood. *Acta Paediatrica Scandinavica* 1979;68:23.
- [445] Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Paliard X, Banchereau J, Spits H, Devries JE. IgE production by normal human B-cells induced by alloreactive T-cell clones is mediated by IL-4 and suppressed by IFN-gamma. *Journal of Immunology* 1988;141:1218.
- [446] Lundgren M, Persson U, Larsson P, Magnusson C, Smith CIE, Hammarstrom L, Severinson E. Interleukin-4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B-cells. *European Journal of Immunology* 1989;19:1311.
- [447] Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B-cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *Journal of Immunology* 1993;150:3671.

- [448] Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal-antibody induces human B-cells gamma-subclass-specific isotype switch - switching to gamma-1, gamma-3, and gamma-4, but not gamma-2. *Journal of Immunology* 1995;155:2318.
- [449] Briere F, Servetdelprat C, Bridon J, Saintremy JM, Banchereau J. Human interleukin - 10 induces naïve surface-immunoglobulin D+ (SIGD(+)) B-cells to secrete IgG1 and IgG3. *Journal of Experimental Medicine* 1994;179:757.
- [450] Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *Journal of Immunology* 1998;160:3555.
- [451] Kawano Y, Noma T, Yata J. Regulation of human-IgG subclass production by cytokines - IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *Journal of Immunology* 1994;153:4948.
- [452] Levy J, EspanolBoren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EAM, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafo V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *Journal of Pediatrics* 1997;131:47.
- [453] Ferrari S, Giliani S, Insalaco A, Al-Ghoniaim A, Soresina AR, Loubser M, Avanzini MA, Marconi M, Badolato R, Ugazio AG, Levy Y, Catalan N, Durandy A, Tbakhi A, Notarangelo LD, Plebani A. Mutations of CD40 gene cause an autosomal recessive form of immunodeficiency with hyper IgM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:12614.
- [454] Eisenstein EM, Chua K, Strober W. B-cell differentiation defects in common variable immunodeficiency are ameliorated after stimulation with anti-CD40 antibody and IL-10. *Journal of Immunology* 1994;152:5957.
- [455] Nonoyama S, Farrington M, Ishida H, Howard M, Ochs HD. Activated B-cells from patients with common variable immunodeficiency proliferate and synthesize immunoglobulin. *Journal of Clinical Investigation* 1993;92:1282.
- [456] Friman V, Hanson LA, Bridon JM, Tarkowski A, Banchereau J, Briere F. IL-10-driven immunoglobulin production by B lymphocytes from IgA-deficient individuals correlates to infection proneness. *Clinical and Experimental Immunology* 1996;104:432.
- [457] Vercelli D, Jabara HH, Arai KI, Geha RS. Induction of human IgE synthesis requires interleukin-4 and T/B cell-interactions involving the T-cell receptor CD3 complex and MHC class-II antigens. *Journal of Experimental Medicine* 1989;169:1295.
- [458] Oettgen HC. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts. *Current Opinion in Immunology* 2000;12:618.

- [459] Jabara HH, Fu SM, Geha RS, Vercelli D. Cd40 and IgE - synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin-4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B-cells. *Journal of Experimental Medicine* 1990;172:1861.
- [460] Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai KI, Banchereau J, Devries JE. IgE production by normal human-lymphocytes is induced by interleukin-4 and suppressed by interferon-gamma and interferon-alpha and prostaglandin-E2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988;85:6880.
- [461] Pan Q, Hammarstrom L. Molecular basis of IgG subclass deficiency. *Immunological Reviews* 2000;178:99.
- [462] Fujieda S, Saxon A, Zhang K. Direct evidence that gamma 1 and gamma 3 switching in human B cells is interleukin-10 dependent. *Molecular Immunology* 1996;33:1335.
- [463] Hummelshoj L, Ryder LP, Poulsen LK. The role of the interleukin-10 subfamily members in immunoglobulin production by human B cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006;64:40.
- [464] Banchereau J, Rousset F. Human-B lymphocytes - phenotype, proliferation and differentiation. *Advances in Immunology* 1992;52:125.
- [465] Pene J, Gauchat JF, Lecart S, Drouet E, Guglielmi P, Boulay V, Delwail A, Foster D, Lecron JC, Yssel H. Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG(1) and IgG(3) by human B cells. *Journal of Immunology* 2004;172:5154.
- [466] Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Kuppers R. Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological Reviews* 1998;162:261.
- [467] Bleesing JJH, Fleisher TA. Human B cells express a CD45 isoform that is similar to murine B220 and is downregulated with acquisition of the memory B-cell marker CD27. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry* 2003;51B:1.
- [468] Brighenti A, Andrusis M, Geissinger E, Roth S, Muller-Hermelink HK, Rudiger T. Extrafollicular proliferation of B cells in the absence of follicular hyperplasia: a distinct reaction pattern in lymph nodes correlated with primary or recall type responses. *Histopathology* 2005;47:90.
- [469] Ehrhardt GRA, Hsu JT, Gartland L, Leu CM, Zhang SY, Davis RS, Cooper MD. Expression of the immunoregulatory molecule FcRH4 defines a distinctive tissue-based population of memory B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2005;202:783.

[470] Bataille R, Jego G, Robillard N, Barille-Nion S, Harousseau J-L, Moreau P, Amiot M, Pellat-Deceunynck C. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica-the Hematology Journal* 2006;91:1234.

[471] Bohnhorst JO, Bjorgan MB, Thoen JE, Natvig JB, Thompson KM. Bm1-Bm5 classification of peripheral blood B cells reveals circulating germinal center founder cells in healthy individuals and disturbance in the B cell subpopulations in patients with primary Sjogren's syndrome. *Journal of Immunology* 2001;167:3610.

[472] Wei C, Anolik J, Cappione A, Zheng B, Pugh-Bernard A, Brooks J, Lee E-H, Milner ECB, Sanz I. A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology* 2007;178:6624.

[473] Weill JC, Weller S, Reynaud CA. A bird's eye view on human B cells. *Seminars in Immunology* 2004;16:277.

[474] Kyaw T, Tipping P, Toh B-H, Bobik A. Current understanding of the role of B cell subsets and intimal and adventitial B cells in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 2011;22:373.

[475] Jacquot S, Kobata T, Iwata S, Morimoto C, Schlossman SF. CD154/CD40 and CD70/CD27 interactions have different and sequential functions in T cell-dependent B cell responses - Enhancement of plasma cell differentiation by CD27 signaling. *Journal of Immunology* 1997;159:2652.

[476] Calame K. Transcription factors that regulate memory in humoral responses. *Immunological Reviews* 2006;211:269.

[477] Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology* 2007;8:463.

[478] Jourdan M, Caraux A, De Vos J, Fiol G, Larroque M, Cognot C, Bret C, Duperray C, Hose D, Klein B. An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 2009;114:5173.

[479] Medina F, Segundo C, Campos-Caro A, Gonzalez-Garcia I, Brieva JA. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* 2002;99:2154.

[480] Jego G, Robillard N, Puthier D, Amiot M, Accard F, Pineau D, Harousseau JL, Bataille R, Pellat-Deceunynck C. Reactive plasmacytoses are expansions of plasmablasts retaining the capacity to differentiate into plasma cells. *Blood* 1999;94:701.

- [481] Blink EJ, Light A, Kallies A, Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM. Early appearance of germinal center-derived memory B cells and plasma cells in blood after primary immunization. *Journal of Experimental Medicine* 2005;201:545.
- [482] Horst A, Hunzelmann N, Arce S, Herber M, Manz RA, Radbruch A, Nischt R, Schmitz J, Assenmacher M. Detection and characterization of plasma cells in peripheral blood: correlation of IgE(+) plasma cell frequency with IgE serum titre. *Clinical and Experimental Immunology* 2002;130:370.
- [483] Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Current Opinion in Immunology* 2006;18:265.
- [484] Hayakawa K, Hardy RR, Stall AM, Herzenberg LA. Immunoglobulin-bearing B-cells reconstitute and maintain the murine LY-1 B-cell lineage. *European Journal of Immunology* 1986;16:1313.
- [485] Oracki SA, Walker JA, Hibbs ML, Corcoran LM, Tarlinton DM. Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews* 2010;237:140.
- [486] Ernst P, Smale ST. Combinatorial regulation of transcription .1. general-aspects of transcriptional control. *Immunity* 1995;2:311.
- [487] Falkner FG, Zachau HG. Correct transcription of an immunoglobulin-K gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* 1984;310:71.
- [488] Ballard DW, Bothwell A. Mutational analysis of the immunoglobulin heavy-chain promoter region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:9626.
- [489] Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy-chain genes. *Cell* 1983;33:729.
- [490] Sakai E, Bottaro A, Davidson L, Sleckman BP, Alt FW. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:1526.
- [491] Engler P, Roth P, Kim JY, Storb U. Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene. *Journal of Immunology* 1991;146:2826.
- [492] Sablitzky F, Serwe M. VDJ recombination in B-cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the IgH intron Enhancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 1993:234.

- [493] Chen JZ, Trounstein M, Alt FW, Young F, Kurahara C, Loring JF, Huszar D. Immunoglobulin gene rearrangement in B-cell deficient mice generated by targeted deletion of the J(H) locus. *International Immunology* 1993;5:647.
- [494] Lefranc M-PaL, G. Molecular genetics of Immunoglobulin allotype expression
In: *The Human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation*. Pergamon Press 1990:43.
- [495] Ehrenstein M. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Immunology* 2011;135:22.
- [496] Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Current Opinion in Immunology* 1995;7:812.
- [497] Haury M, Sundblad A, Grandien A, Barreau C, Coutinho A, Nobrega A. The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *European Journal of Immunology* 1997;27:1557.
- [498] Czajkowsky DM, Shao Z. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:14960.
- [499] Chen FH, Arya SK, Rinfret A, Isenman DE, Shulman MJ, Painter RH. Domain-switched mouse IgM/Ig2b hybrids indicate individual roles for C mu 2, C mu 3, and C mu 4 domains in the regulation of the interaction of IgM with complement C1q. *Journal of Immunology* 1997;159:3354.
- [500] Shima H, Takatsu H, Fukuda S, Ohmae M, Hase K, Kubagawa H, Wang J-Y, Ohno H. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International Immunology* 2010;22:149.
- [501] Kubagawa H, Oka S, Kubagawa Y, Torii I, Takayama E, Kang D-W, Gartland GL, Bertoli LF, Mori H, Takatsu H, Kitamura T, Ohno H, Wang J-Y. Identity of the elusive IgM Fc receptor (Fc mu R) in humans. *Journal of Experimental Medicine* 2009;206:2779.
- [502] Honda S-i, Kurita N, Miyamoto A, Cho Y, Usui K, Takeshita K, Takahashi S, Yasui T, Kikutani H, Kinoshita T, Fujita T, Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Shibuya A. Enhanced humoral immune responses against T-independent antigens in Fc alpha/mu R-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:11230.
- [503] Shibuya A, Sakamoto N, Shimizu Y, Shibuya K, Osawa M, Hiroyama T, Eyre HJ, Sutherland GR, Endo Y, Fujita T, Miyabayashi T, Sakano S, Tsuji T, Nakayama E, Phillips JH, Lanier LL, Nakauchi H. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nature Immunology* 2000;1:441.

- [504] Turner MW, Bennich HH, Natvig JB. Simple method of subtyping human G-myeloma proteins based on sensitivity to pepsin digestion. *Nature* 1970;225:853.
- [505] Aalberse RC, Vandergaag R, Vanleeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies .1. prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *Journal of Immunology* 1983;130:722.
- [506] Djurup R. The subclass nature and clinical-significance of the IgG antibody-response in patients undergoing allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 1985;40:469.
- [507] Perelmutter L. IgG4 - non-IgE mediated atopic disease. *Annals of Allergy* 1984;52:64.
- [508] Hammarstrom L, Lefranc G, Lefranc MP, Persson MA, Smith CI. Aberrant pattern of anti-carbohydrate antibodies in immunoglobulin class or subclass-deficient donors. *Monographs in allergy* 1986;20:50.
- [509] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology* 2007;7:715.
- [510] Stuart LM, Ezekowitz RAB. Phagocytosis: Elegant complexity. *Immunity* 2005;22:539.
- [511] Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, They C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189:371.
- [512] Vely F, Vivier E. Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *Journal of Immunology* 1997;159:2075.
- [513] Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daeron M. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009;113:3716.
- [514] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:34.
- [515] Dutertre C-A, Bonnin-Gelize E, Pulford K, Bourel D, Fridman W-H, Teillaud J-L. A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory Fc gamma RIIB modulating antibody-dependent function. *Journal of Leukocyte Biology* 2008;84.
- [516] Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma Rs in Health and Disease. *Negative Co-Receptors and Ligands* 2011;350:105.

- [517] Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc gamma RIIB-induced B cell apoptosis. *Immunity* 1999;10:753.
- [518] Xiang Z, Cutler AJ, Brownlie RJ, Fairfax K, Lawlor KE, Severinson E, Walker EU, Manz RA, Tarlinton DM, Smith KGC. Fc gamma RIIB controls bone marrow plasma cell persistence and apoptosis. *Nature Immunology* 2007;8:419.
- [519] Bolland S, Ravetch JV. Spontaneous autoimmune disease in Fc gamma RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 2000;13:277.
- [520] Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 1996;379:346.
- [521] Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV, Diamond B. Selective dysregulation of the Fc gamma IIB receptor on memory B cells in SLE. *Journal of Experimental Medicine* 2006;203:2157.
- [522] Tackenberg B, Jelcic I, Baerenwaldt A, Oertel WH, Sommer N, Nimmerjahn F, Luenemann JD. Impaired inhibitory Fc gamma receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:4788.
- [523] Baerenwaldt A, Nimmerjahn F. Immune regulation - Fc gamma RIIB - regulating the balance between protective and autoreactive immune responses. *Immunology and Cell Biology* 2008;86:482.
- [524] Bruhns P, Samuelsson A, Pollard JW, Ravetch JV. Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease. *Immunity* 2003;18:573.
- [525] Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MCI, Ravetch JV. Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:19571.
- [526] Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, Cal AN, Raju TS. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunology* 2007;44:1524.
- [527] Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, Ravetch JV. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 2011;475:110.
- [528] Hamilton RG. Human-IgG subclass measurements in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry* 1987;33:1707.
- [529] Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *Journal of Pathology* 2006;208:270.

- [530] Morton HC, Vandenherikoudijk IE, Vosseveld P, Snijders A, Verhoeven AJ, Capel PJA, Vandewinkel JGJ. Functional association between the human myeloid immunoglobulin-A Fc receptor (CD89) and FcR gamma-chain association. *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:29781.
- [531] Monteiro RC, van de Winkel JGJ. IgA Fc receptors. *Annual Review of Immunology* 2003;21:177.
- [532] Hamre R, Farstad IN, Brandtzaeg P, Morton HC. Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003;57:506.
- [533] Chevailler A, Monteiro RC, Kubagawa H, Cooper MD. Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear-cells in blood and lymphoid-tissue. *Journal of Immunology* 1989;142:2244.
- [534] van Zandbergen G, Westerhuis R, Mohamad NK, van de Winkel JGJ, Daha MR, van Kooten C. Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (Fc alpha RI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *Journal of Immunology* 1999;163:5806.
- [535] van Egmond M, van Vuuren AJH, Morton HC, van Spriel AB, Shen L, Hofhuis FMA, Saito T, Mayadas TN, Verbeek JS, van de Winkel JGJ. Human immunoglobulin A receptor (Fc alpha RI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* 1999;93:4387.
- [536] Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffie C, Henin D, Benhamou M, Pretolani M, Blank U, Monteiro RC. Identification of Fc alpha RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: Dual role of FcR gamma ITAM. *Immunity* 2005;22:31.
- [537] Honorio-Fransa AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS, Monteiro RC. Colostral neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. *Journal of Leukocyte Biology* 2001;69:289.
- [538] Wu J, Ji C, Xie F, Langefeld CD, Qian K, Gibson AW, Edberg JC, Kimberly RP. Fc alpha RI (CD89) Alleles determine the proinflammatory potential of serum IgA. *Journal of Immunology* 2007;178:3973.
- [539] Gorter A, Hiemstra PS, Klar-Mohamad N, van Es LA, Daha MR. Binding and degradation of soluble aggregates of IgA by rat peritoneal macrophages. *Advances in experimental medicine and biology* 1987;216B:1333.
- [540] Fanger MW, Shen L, Pugh J, Bernier GM. Sub-populations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 1980;77:3640.

- [541] Monteiro RC, Moura IC, Launay P, Tsuge T, Haddad E, Benhamou M, Cooper MD, Arcos-Fajardo M. Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy. *Trends in Molecular Medicine* 2002;8:464.
- [542] Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, Monteiro RC. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *Journal of Experimental Medicine* 2001;194:417.
- [543] Tomana M, Kulhavy R, Mestecky J. Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin-a by human-liver. *Gastroenterology* 1988;94:762.
- [544] Rifai A, Fadden K, Morrison SL, Chintalacheruvu KR. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191:2171.
- [545] Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin-A antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:6901.
- [546] Bomsel M, Heyman M, Hocini H, Lagaye S, Belec L, Dupont C, Desgranges C. Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity* 1998;9:277.
- [547] Fujioka H, Emancipator SN, Aikawa M, Huang DS, Blatnik F, Karban T, DeFife K, Mazanec MB. Immunocytochemical colocalization of specific immunoglobulin A with Sendai virus protein in infected polarized epithelium. *Journal of Experimental Medicine* 1998;188:1223.
- [548] Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R, Olivo-Marin JC, Sansonetti PJ, Phalipon A. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity* 2003;18:739.
- [549] Miletic VD, Frank MM. Complement immunoglobulin interactions. *Current Opinion in Immunology* 1995;7:41.
- [550] Janoff EN, Fasching C, Orenstein JM, Rubins JB, Opstad NL, Dalmaso AP. Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 1999;104:1139.
- [551] Stad RK, Bogers W, Thoomesvandersluys ME, Vanes LA, Daha MR. In vivo activation of complement by IgA in a rat model. *Clinical and Experimental Immunology* 1992;87:138.

- [552] Roos A, Bouwman LH, van Gijlswijk-Janssen DJ, Faber-Krol MC, Stahl GL, Daha MR. Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *Journal of Immunology* 2001;167:2861.
- [553] Valerius T, Stockmeyer B, vanSpriel AB, Graziano RF, vandenHerikOudijk IE, Repp R, Deo YM, Lund J, Kalden JR, Gramatzki M, vandeWinkel JGJ. Fc alpha RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 1997;90:4485.
- [554] Huls G, Heijnen I, Cuomo E, van der Linden J, Boel E, van de Winkel JGJ, Logtenberg T. Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Research* 1999;59:5778.
- [555] Gould HJ, Sutton BJ, Bevil AJ, Bevil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annual Review of Immunology* 2003;21:579.
- [556] Lin SQ, Cicala C, Scharenberg AM, Kinet JP. The Fc epsilon RI beta subunit functions as an amplifier of Fc epsilon RI gamma-mediated cell activation signals. *Cell* 1996;85:985.
- [557] Dombrowicz D, Flamand V, Miyajima I, Ravetch JV, Galli SJ, Kinet JP. Absence of Fc(epsilon)RI alpha chain results in upregulation of Fc gamma RIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis - Evidence of competition between Fc(epsilon)RI and Fc gamma RIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:915.
- [558] Burd PR, Thompson WC, Max EE, Mills FC. Activated mast-cells produce IL-13. *Journal of Experimental Medicine* 1995;181:1373.
- [559] Ikeda K, Nakajima H, Suzuki K, Kagami SI, Hirose K, Suto A, Saito Y, Iwamoto I. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 2003;101:3594.
- [560] Gould HJ, Sutton BJ. IgE in allergy and asthma today. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:205.
- [561] Acharya M, Borland G, Edkins AL, MacLellan LM, Matheson J, Ozanne BW, Cushley W. CD23/Fc epsilon RII: molecular multi-tasking. *Clinical and Experimental Immunology* 2010;162:12.
- [562] Cheng LE, Wang Z-E, Locksley RM. Murine B Cells Regulate Serum IgE Levels in a CD23-Dependent Manner. *Journal of Immunology* 2010;185:5040.
- [563] Karagiannis SN, Warrack JK, Jennings KH, Murdock PR, Christie G, Moulder K, Sutton BJ, Gould HJ. Endocytosis and recycling of the complex between CD23 and HLA-DR in human B cells. *Immunology* 2001;103:319.

- [564] Floresromo L, Johnson GD, Ghaderi AA, Stanworth DR, Veronesi A, Gordon J. Functional implication for the topographical relationship between MHC class-II and the low-affinity IgE receptor - Occupancy of CD23 prevents lymphocytes-B from stimulating allogeneic mixed lymphocyte-responses. *European Journal of Immunology* 1990;20:2465.
- [565] Getahun A, Hjelm F, Heyman B. IgE enhances antibody and T cell responses in vivo via CD23(+) B cells. *Journal of Immunology* 2005;175:1473.
- [566] Hjelm F, Karlsson MCI, Heyman B. A novel B cell-mediated transport of IgE-immune complexes to the follicle of the spleen. *Journal of Immunology* 2008;180:6604.
- [567] Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunological Reviews* 2011;242:128.
- [568] Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, Johnson LL, Swain SL, Lund FE. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology* 2000;1:475.
- [569] Sanz I, Anolik JH, Looney RJ. B cell depletion therapy in autoimmune diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 2007;12:2546.
- [570] Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes - key regulators of immunity. *Current Opinion in Immunology* 2008;20:332.
- [571] Pistoia V. Production of cytokines by human B cells in health and disease. *Immunology Today* 1997;18:343.
- [572] Lund FE, Garvy BA, Randall TD, Harris DP. Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease. *Current directions in autoimmunity* 2005;8:25.
- [573] Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *Journal of Immunology* 2006;176:705.
- [574] Schultze JL, Michalak S, Lowne J, Wong A, Gilleece MH, Gribben JG, Nadler LM. Human non-germinal center B cell interleukin (IL)-12 production is primarily regulated by T cell signals CD40 ligand, interferon gamma, and IL-10: Role of B cells in the maintenance of T cell responses. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189:1.
- [575] Gagro A, Servis D, Cepika AM, Toellner KM, Grafton G, Taylor DR, Branica S, Gordon J. Type I cytokine profiles of human naive and memory B lymphocytes: a potential for memory cells to impact polarization. *Immunology* 2006;118:66.
- [576] Daridon C, Guerrier T, Devauchelle V, Saraux A, Pers J-O, Youinou P. Polarization of B effector cells in Sjogren's syndrome. *Autoimmunity Reviews* 2007;6:427.

- [577] Johansson-Lindbom B, Borrebaeck CAK. Germinal center B cells constitute a predominant physiological source of IL-4: Implication for Th2 development in vivo. *Journal of Immunology* 2002;168:3165.
- [578] Hajoui O, Janani R, Tulic M, Joubert P, Ronis T, Hamid Q, Zheng H, Mazer BD. Synthesis of IL-13 by human B lymphocytes: Regulation and role in IgE production. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2004;114:657.
- [579] Barr TA, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D. TLR-mediated stimulation of APC: Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *European Journal of Immunology* 2007;37:3040.
- [580] Cariappa A, Boboila C, Moran ST, Liu H, Shi HN, Pillai S. The recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell Populations. *Journal of Immunology* 2007;179:2270.
- [581] Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE. Regulation of IFN-gamma production by B effector 1 cells: Essential roles for T-bet and the IFN-gamma receptor. *Journal of Immunology* 2005;174:6781.
- [582] Harris DP, Goodrich S, Mohrs K, Mohrs M, Lund FE. Cutting edge: The development of IL-4-producing B cells (B effector 2 cells) is controlled by IL-4, IL-4 receptor alpha, and Th2 cells. *Journal of Immunology* 2005;175:7103.
- [583] Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology* 2002;3:944.
- [584] Mann MK, Maresz K, Shrives LP, Tan Y, Dittel BN. B cell regulation of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology* 2007;178:3447.
- [585] Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2003;197:489.
- [586] Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *Journal of Immunology* 2007;178:7868.
- [587] Mangan NE, Fallon RE, Smith P, van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *Journal of Immunology* 2004;173:6346.
- [588] Gillan V, Lawrence RA, Devaney E. B cells play a regulatory role in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*. *International Immunology* 2005;17:373.

- [589] Caver TE, Osullivan FX, Gold LI, Gresham HD. Intracellular demonstration of active TGF beta 1 in B cells and plasma cells of autoimmune mice - IgG-Bound TGF beta 1 suppresses neutrophil function and host defense against Staphylococcus aureus infection. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98:2496.
- [590] Parekh VV, Prasad DVR, Banerjee PP, Joshi BN, Kumar A, Mishra GC. B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8(+) T cells: Role of TGF-beta 1. *Journal of Immunology* 2003;170:5897.
- [591] Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nature Reviews Immunology* 2010;10:236.
- [592] Sun CM, Deriaud E, Leclerc C, Lo-Man R. Upon TLR9 signaling, CD5(+) B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 2005;22:467.
- [593] Walker WE, Goldstein DR. Neonatal B cells suppress innate toll-like receptor immune responses and modulate alloimmunity. *Journal of Immunology* 2007;179:1700.
- [594] Zhang X, Deriaud E, Jiao X, Braun D, Leclerc C, Lo-Man R. Type I interferons protect neonates from acute inflammation through interleukin 10-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204:1107.
- [595] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002;16:219.
- [596] Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 2007;178:6092.
- [597] Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *Journal of Clinical Immunology* 2005;25:29.
- [598] Brummel R, Lenert P. Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology* 2005;174:2429.
- [599] Mauri C. Regulation of immunity and autoimmunity by B cells. *Current Opinion in Immunology* 2010;22:761.
- [600] Gibbons DL, Rowe M, Cope AP, Feldmann M, Brennan FM. Lymphotoxin acts as an autocrine growth-factor for epstein-barr virus-transformed B-cells and differentiated burkitt-lymphoma cell-lines. *European Journal of Immunology* 1994;24:1879.

- [601] Kehrl JH, Rieckmann P, Kozlow E, Fauci AS. Lymphokine production by B-cells from normal and HIV-infected individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1992;651:220.
- [602] Nikolajczyk BS. B cells as under-appreciated mediators of non-auto-immune inflammatory disease. *Cytokine* 2010;50:234.
- [603] Linkerisraeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozerichen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus-erythematosus - A putative role in pathogenesis. *Journal of Immunology* 1991;147:117.
- [604] Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: A role in immune regulation? *Journal of Immunology* 2004;172:3422.
- [605] Kurtjones EA, Liano D, Hayglass KA, Benacerraf B, Sy MS, Abbas AK. The role of antigen-presenting B-cells in T-cell priming in vivo-studies of B-cell-deficient mice. *Journal of Immunology* 1988;140:3773.
- [606] Janeway CA, Ron J, Katz ME. The B-cells is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph-nodes. *Journal of Immunology* 1987;138:1051.
- [607] Shirota H, Sano K, Hirasawa N, Terui T, Ohuchi K, Hattori T, Tamura G. B cells capturing antigen conjugated with CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 cells by elaborating IL-12. *Journal of Immunology* 2002;169:787.
- [608] Rodriguez-Pinto D, Moreno J. B cells can prime naive CD4(+) T cells in vivo in the absence of other professional antigen-presenting cells in a CD154-CD40-dependent manner. *European Journal of Immunology* 2005;35:1097.
- [609] Sfikakis PP, Boletis JN, Lionaki S, Vigklis V, Fragiadaki KG, Iniotaki A, Moutsopoulos HM. Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40 ligand - An open-label trial. *Arthritis and Rheumatism* 2005;52:501.
- [610] Hamaguchi Y, Uchida J, Cain DW, Venturi GM, Poe JC, Haas KM, Tedder TF. The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice. *Journal of Immunology* 2005;174:4389.
- [611] Ngo VN, Cornall RJ, Cyster JG. Splenic T zone development is B cell dependent. *Journal of Experimental Medicine* 2001;194:1649.
- [612] Golovkina TV, Shlomchik M, Hannum L, Chervonsky A. Organogenic role of B lymphocytes in mucosal immunity. *Science* 1999;286:1965.
- [613] Takemura S, Klimiuk PA, Braun A, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *Journal of Immunology* 2001;167:4710.

- [614] Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *Journal of Experimental Medicine* 1999;189:159.
- [615] Gonzalez M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH, Noelle RJ. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *Journal of Experimental Medicine* 1998;187:997.
- [616] Weyand CM, Seyler T, Goronzy JJ. B cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Research & Therapy* 2005;7:S9.
- [617] Barone F, Bombardieri M, Manzo A, Blades MC, Morgan PR, Challacombe SJ, Valesini G, Pitzalis C. Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjogren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism* 2005;52:1773.
- [618] Weyand CM, Kang YM, Kurtin PJ, Goronzy JJ. The power of the third dimension: tissue architecture and autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 2003;15:259.
- [619] Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. *Seminars in Immunopathology* 2009;31:455.
- [620] Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathology* 2004;14:164.
- [621] Peterson KS, Huang JF, Zhu J, D'Agati V, Liu XJ, Miller N, Erlander MG, Jackson MR, Winchester RJ. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *Journal of Clinical Investigation* 2004;113:1722.
- [622] Ponnuswamy P, Van Vre EA, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: spotlight on B- and T-cells. *Vascular pharmacology* 2012;56:193.
- [623] de Jager SCA, Kuiper J. Vaccination strategies in atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis* 2011;106:796.
- [624] Rossmann A, Henderson B, Heidecker B, Seiler R, Fraedrich G, Singh M, Parson W, Keller M, Grubeck-Loebenstien B, Wick G. T-cells from advanced atherosclerotic lesions recognize hHSP60 and have a restricted T-cell receptor repertoire. *Experimental Gerontology* 2008;43:229.

- [625] Benagiano M, D'Elis MM, Amedei A, Azzurri A, van der Zee R, Ciervo A, Rombola G, Romagnani S, Cassone A, Del Prete G. Human 60-kDa heat shock protein is a target autoantigen of T cells derived from atherosclerotic plaques. *Journal of Immunology* 2005;174:6509.
- [626] Baty D, & Chames, P. Approved antibodies for imaging and therapeutic : an update. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2006;21:255.
- [627] Thibodeaux BA, Roehrig JT. Development of a Human-Murine Chimeric Immunoglobulin M Antibody for Use in the Serological Detection of Human Flavivirus Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009;16.
- [628] Hahn T, Toker L, Budilovsky S, Aderka D, Eshhar Z, Wallach D. Use of monoclonal-antibodies to a human cytotoxin for its isolations and for examining the self-induction of resistance to this protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82.
- [629] Laffly E, Sodoyer R. Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Human antibodies* 2005;14:33.
- [630] Fernandez LA, Sola I, Enjuanes L, de Lorenzo V. Specific secretion of active single-chain Fv antibodies into the supernatants of *Escherichia coli* cultures by use of the hemolysin system. *Applied and Environmental Microbiology* 2000;66.
- [631] Wright A, Morrison SL. Effect of glycosylation on antibody function: Implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology* 1997;15:26.
- [632] Krapp S, Mimura Y, Jefferis R, Huber R, Sonderrmann P. Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *Journal of Molecular Biology* 2003;325:979.
- [633] Jefferis R. Glycosylation of antibody therapeutics: optimisation for purpose. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2009;483:223.
- [634] Jefferis R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action. *Trends in Pharmacological Sciences* 2009;30:356.
- [635] Jefferis R. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnology Progress* 2005;21:11.
- [636] Werner RG, Kopp K, Schlueter M. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica* 2007;96:17.
- [637] Chadd HE, Chamow SM. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology* 2001;12:188.

- [638] Chusainow J, Yang YS, Yeo YHM, Toh PC, Asvadi P, Wong NSC, Yap MGS. A Study of Monoclonal Antibody-Producing CHO Cell Lines: What Makes a Stable High Producer? *Biotechnology and Bioengineering* 2009;102:1182.
- [639] Birnboim HC, Doly J. Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 1979;7:1513.
- [640] Sambrook, Fritsch, Maniatis. *Molecular cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.*
- [641] Canducci F, Saita D, Foglieni C, Piscopiello MR, Chiesa R, Colombo A, Cianflone D, Maseri A, Clementi M, Burioni R. Cross-Reacting Antibacterial Auto-Antibodies Are Produced within Coronary Atherosclerotic Plaques of Acute Coronary Syndrome Patients. *PloS one* 2012;7.
- [642] Fritz JH, Rojas OL, Simard N, McCarthy DD, Hapfelmeier S, Rubino S, Robertson SJ, Larijani M, Gosselin J, Ivanov II, Martin A, Casellas R, Philpott DJ, Girardin SE, McCoy KD, Macpherson AJ, Paige CJ, Gommerman JL. Acquisition of a multifunctional IgA(+) plasma cell phenotype in the gut. *Nature* 2012;481:199.
- [643] Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, Tiglaio E, Figueiredo J-L, Iwamoto Y, Theurl I, Gorbatoov R, Waring MT, Chicoine AT, Mouded M, Pittet MJ, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK. Innate Response Activator B Cells Protect Against Microbial Sepsis. *Science* 2012;335:597.
- [644] Kyaw T TP, Bobik A, Toh BH. Protective Role of Natural IgM-Producing B1a Cells in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2012.
- [645] Nolte MA, Belien JAM, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WWJ, van Rooijen N, Kraal G, Mebius RE. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *Journal of Experimental Medicine* 2003;198.
- [646] Itano AA, Jenkins MK. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* 2003;4.
- [647] Liang Y, Zhang L, Gao J, Hu D, Ai Y. Rituximab for Children with Immune Thrombocytopenia: A Systematic Review. *Plos One* 2012;7.
- [648] Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, Morel P, Van den Neste E, Salles G, Gaulard P, Reyes F, Gisselbrecht C. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2002;346.
- [649] Shlomchik MJ. Sites and stages of autoreactive B cell activation and regulation. *Immunity* 2008;28.

[650] Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *Journal of Immunology* 2009;182:7459.

[651] Kosco-Vilbois MH. Opinion - Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nature Reviews Immunology* 2003;3.

[652] Allen CDC, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 2007;315.

[653] Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 2006;6.

[654] Browning JL. B cells move to centre stage: novel opportunities for autoimmune disease treatment. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006;5.

[655] Timmer TCG, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TWJ, Tak PP, Verweij CL, Mebius RE, van der Pouw Kraan TCTM. Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology - Identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis. *Arthritis and Rheumatism* 2007;56.

[656] Schroder AE, Greiner A, Seyfert C, Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93.

[657] Cupedo T, Mebius RE. Cellular interactions in lymph node development. *Journal of Immunology* 2005;174.

[658] Cyster JG. Lymphoid organ development and cell migration. *Immunological Reviews* 2003;195.

[659] Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology* 2006;7.

[660] Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF and APRIL: A tutorial on B cell survival. *Annual Review of Immunology* 2003;21.

[661] Kyaw T, Tay C, Hosseini H, Kanellakis P, Gadowski T, Mackay F, Tipping P, Bobik A, Toh B-H. 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:e29371.

[662] Sage AP, Tsiantoulas D, Baker L, Harrison J, Masters L, Murphy D, Loinard C, Binder CJ, Mallat Z. BAFF Receptor Deficiency Reduces the Development of

Atherosclerosis in Mice-Brief Report. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2012;32.

8