



Régulation immunitaire, angiogenèse et homéostasie tissulaire au cours des vascularites des gros vaisseaux

Anne-Claire Desbois

► To cite this version:

Anne-Claire Desbois. Régulation immunitaire, angiogenèse et homéostasie tissulaire au cours des vascularites des gros vaisseaux. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066268 . tel-01894892

HAL Id: tel-01894892

<https://theses.hal.science/tel-01894892>

Submitted on 13 Oct 2018

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

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

Régulation immunitaire, angiogenèse et homéostasie tissulaire au cours des vascularites des gros vaisseaux

Thèse soutenue par Anne-Claire Desbois

Sous la direction des Prs Patrice Cacoub et David Saadoun

Thèse soutenue le 11 octobre 2017 devant le jury de thèse composé :

Monsieur le Professeur Ait Oufella	Président
Monsieur le Professeur Bernard Bonnotte	Rapporteur
Monsieur le Professeur Vassili Soumelis	Rapporteur
Madame Stéphanie Graff-Dubois	Examinatrice
Monsieur le Professeur Bertrand Godeau	Examineur
Monsieur le Professeur Patrick Bruneval	Examineur

Remerciements

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur Hafid Ait Oufella qui me fait l'honneur de présider le jury de soutenance de ma thèse, ainsi que Messieurs les Professeurs Bernard Bonnotte et Vassili Soumelis qui ont accepté d'être rapporteurs. Je remercie vivement également Madame Stéphanie Graff-Dubois et Messieurs les Professeurs Bertrand Godeau et Patrick Bruneval qui ont accepté d'être examinateurs ainsi que Messieurs les Professeurs Patrice Cacoub et David Saadoun qui ont dirigé ce travail de recherche. Je remercie le Professeur David Klatzmann de m'avoir accueillie dans son unité de recherche.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont épaulé lors de ces travaux, en particulier mon mari, ma famille, amis et tous mes collègues du laboratoire qui ont été d'une aide précieuse au cours de ces trois années ! Une pensée particulière pour Paul, Anna, Marlène, Géraldine, Julien, Fabien, MichèleS, Nathalie, Cornélia, Valentin, Pierre-Axel, Faustine et Sylvain !

Résumé

Les vascularites des gros vaisseaux comprennent principalement la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes. Elles sont caractérisées par des lésions inflammatoires artérielles, associées à une néo-vascularisation adventitielle importante, une désorganisation architecturale de la paroi artérielle et des lésions fibrotiques, affectant l'aorte et ses principales branches. Ces maladies sont caractérisées par des réponses lymphocytaires Th1 et Th17 excessives et dérégulées. Actuellement, les mécanismes régulant la différenciation lymphocytaire, la réponse endothéliale et l'homéostasie tissulaire en contexte d'inflammation artérielle chronique ne sont pas suffisamment connus.

Dans la 1^{ère} partie de nos travaux, nous avons étudié le rôle de l'IL-33, cytokine sécrétée par les cellules endothéliales en cas de nécrose tissulaire, surexprimée dans les vascularites des gros vaisseaux et impliquée dans la régulation de la réponse immune. Nous avons mis en évidence le rôle immunomodulateur de l'IL-33 dans les vascularites des gros vaisseaux. Cette cytokine favorise en effet directement une différenciation Th2 et une augmentation des lymphocytes T régulateurs (Treg). L'IL-33 exerce également son action immunorégulatrice par le biais des mastocytes qui favorisent également une augmentation majeure des Treg en présence d'IL-33, probablement grâce à la sécrétion d'IL-2, essentielle à la survie et l'expansion des Treg et la sécrétion d'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO).

L'IL-33 et les mastocytes ont également un rôle paradoxal en contexte inflammatoire, en favorisant les processus de néo-angiogenèse, d'activation endothéliale et d'augmentation de la perméabilité vasculaire, phénomènes participant au recrutement de cellules inflammatoires sur le site lésionnel. L'axe IL-33/ST2 et les mastocytes, via leurs actions pro-Th2, immunorégulatrice, et pro-angiogénique, sont également associés aux processus de réparation tissulaire, qui pourraient s'avérer délétères en cas d'inflammation persistante, en raison du développement de lésions de fibrose. Si l'IL-33 ne semble pas être directement responsable d'une activation ou d'une prolifération fibroblastique au niveau artériel, les mastocytes activés par du sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux conduisent en revanche à des modifications du phénotype fibroblastique et induisent une augmentation de production de collagène de type 1 et de fibronectine.

Dans la 2^{ème} partie de nos travaux, nous avons mis en évidence des profils de différenciation distincts des lymphocytes T CD4⁺ dans la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes.

Nous avons démontré une augmentation des lymphocytes T folliculaires *helper* (Tfh) circulants dans la maladie de Takayasu. L'augmentation des Tfh chez les patients ayant une maladie de Takayasu est associée à une augmentation des lymphocytes B circulants et à la présence d'organes lymphoïdes ectopiques aortiques. Les Tfh des patients Takayasu gardent les propriétés fonctionnelles des lymphocytes Tfh tissulaires, puisqu'ils favorisent la prolifération des lymphocytes B ainsi que leur différenciation en cellules mémoires. Nos résultats suggèrent donc l'implication d'une coopération lymphocytaire B et T centrale dans la physiopathologie de la maladie de Takayasu, qui pourrait être associée à la présence de lymphocytes B auto-réactifs sécrétant des auto-anticorps.

Abbréviations

Ag: Antigène

AHR: *Aryl hydrocarbon receptor*

AREG: *amphiregulin gene*

BAT: *Biopsie de l'artère temporale*

BLIMP-1: *B lymphocyte induced maturation protein 1*

BCR: *B cell receptor*

CPA : cellules présentatrices de l'antigène

CRP : C-réactive protéine

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CML : cellule musculaires lisse

Fc: fragment constant

GITR: *glucocorticoid induced TNFR*

IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase

Ig: immunoglobuline

IL: interleukine

MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*

MMP: *métalloprotéases*

NK: *Natural Killer*

NET: *neutrophil extracellular traps*

NLR: *NOD-like receptors*

NO: oxide nitrique

PNN: Polynucléaires neutrophiles

RLR: *RIG-like receptors*

STF: Stem Cell Factor

TCR: *T cell receptor*

TEP: Tomographie par emission de positons

Tfh: T folliculaire *helper*

TLR: *Toll like receptors*

Treg: Lymphocytes T régulateurs

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

VZV: *Virus varicelle zona*

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Abbréviations	5
A-Introduction	8
1-Généralités sur la réponse immunitaire physiologique :	8
1a-Réponse immune innée :	9
1b- La réponse adaptative :.....	12
1c- La différenciation lymphocytaire T CD4 :	16
1d-La réponse régulatrice :	25
2- IL-33, cytokine de la famille IL-1 :	31
3-Le mastocyte :	37
4-Rôle de l'activation endothéliale et de l'angiogenèse dans la réponse inflammatoire :	43
5-Inflammation et remodelage tissulaire	48
6-Les vascularites des gros vaisseaux :	55
6a- L'artérite à cellules géantes :	56
6b- La Maladie de Takayasu :	57
6c- Les données histologiques :	59
6d- Physiopathologie des vascularites des gros vaisseaux :	60
6e-Les enjeux de recherche dans les vascularites des gros vaisseaux :	65
B-Objectifs	67
C-Résultats	69
D-Discussion	152
1- Lymphocytes T Folliculaires <i>Helper</i> et vascularites des gros vaisseaux	152
1a-Rôle des lymphocytes T Folliculaires <i>Helper</i> dans la maladie de Takayasu	152
1b-Stimulation antigénique et maladie de Takayasu :	156
1c-Rôle des lymphocytes B dans la maladie de Takayasu	157
2- IL-33, cytokine complexe à l'interface des différentes facettes physiopathologiques des vascularites : de la régulation de la réponse immune au contrôle de l'angiogenèse et de la réparation tissulaire	160
2a-Régulation de la réponse immune :	160
2b-Mastocytes et IL-33 dans la régulation de la réponse immune :	163
2c-Rôle pro-angiogénique de l'Interleukine 33 et des mastocytes:.....	165
2d-IL-33, mastocytes et remodelage tissulaire :	166
3-Conclusions et perspectives :	169
E-Bibliographie	175

A-Introduction

1-Généralités sur la réponse immunitaire physiologique :

La réponse immunitaire a pour objectif de défendre l'organisme contre tout pathogène (bactéries, virus, parasites ou champignons..) et/ou tout signal de danger défini comme un élément de « non-soi ». De ce fait, une réponse immunitaire adaptée et efficace repose sur quatre principes fondamentaux :

- une reconnaissance rapide et efficace des signaux de danger
- un contrôle rapide de l'infection
- un système de régulation efficace
- la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire (pour une réponse plus rapide et plus efficace en cas de réinfection par le même pathogène).

Une réponse immune efficace repose sur une **réponse innée**, d'installation très rapide mais non spécifique, puis sur une **réponse adaptative**, de mise en place plus lente, mais spécifique du pathogène rencontré et très efficace. La réponse adaptative permet la mise en place d'une réponse mémoire lymphocytaire B et T.

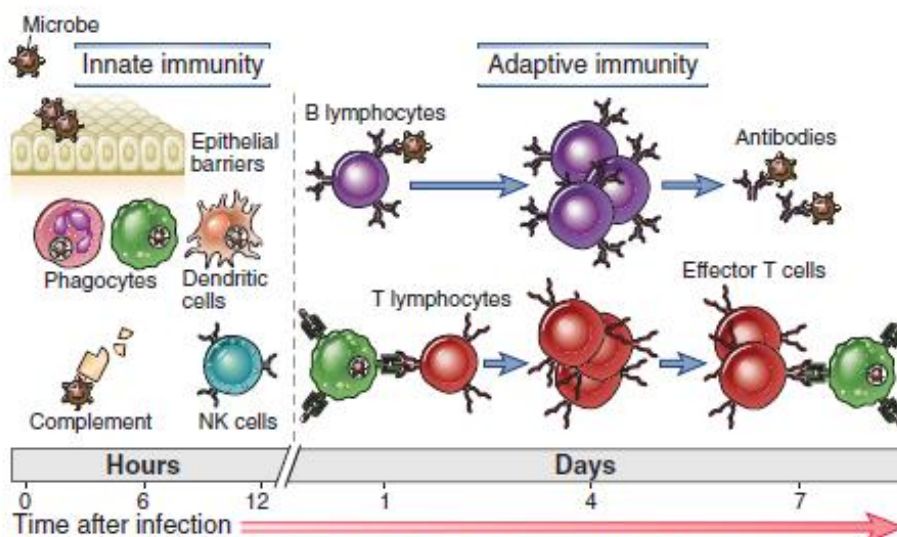


Figure n°1 :

Principales étapes et différents acteurs d'une réponse immunitaire adaptée.

1a-Réponse immune innée :

La première ligne de défense de l'organisme contre tous signaux de danger (infection par exemple) est assurée par une « **réponse innée** » adaptée. La réponse innée est assurée par :

1/ des barrières épithéliales « armées » représentant des barrières physiques contre les micro-organismes et des barrières chimiques du fait de la sécrétion de peptides antimicrobiens

2/ les leucocytes, véritables « patrouilleurs » de l'organisme, composés principalement des macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires neutrophiles (PNN) et *Natural Killer* (NK) et ayant comme principales fonctions :

- la **reconnaissance des signaux de danger** via des récepteurs non spécifiques d'un antigène donné et peu diversifiés. Ces récepteurs regroupent (**figure 2**):
 - les *Toll Like Receptors* (TLR) extra et intracellulaires reconnaissant différents types de composants bactériens ou viraux,
 - les « *sensors* » cytoplasmiques comme la famille des *NOD-like receptors* (NLR) reconnaissant les peptidoglycanes ou la flagelline bactériens ou les *RIG-like receptors* (RLR) reconnaissant l'ARN viral
 - les récepteurs membranaires de la famille des lectines reconnaissant les glycanes d'origine fongique.
- leur **activation** après reconnaissance du signal danger menant à (**figure 3**):
 - * la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment d'IL-1 β , IL-6, TNF α , IFN de type 1 ayant une action antivirale majeure, et de chémokines (IL-8, CCL-2, CCL-3..) permettant le recrutement leucocytaire sur le site infecté.
 - * l'expression de molécules de co-stimulation (CD80-86)

* la phagocytose et la destruction des micro-organismes par les PNN et macrophages via la production de radicaux libres (ROS, iNOS) et d'enzymes protéolytiques

- l'**initiation d'une réponse adaptative** via la présentation des antigènes microbiens aux lymphocytes B et T par les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques notamment).

3/ des molécules solubles préformées (anticorps naturels, protéines du complément, collectines, prentaxines) reconnaissant les pathogènes et ayant deux principaux rôles :

- faciliter l'« opsonisation » des pathogènes par les cellules phagocytaires : une fois complexées aux pathogènes, ces molécules se fixent sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des cellules phagocytaires, facilitant ainsi la destruction du pathogène.
- permettre la destruction directe du microorganisme, via par exemple l'activation du complément induisant la formation d'un complexe d'attaque membranaire aboutissant à la destruction directe du pathogène.

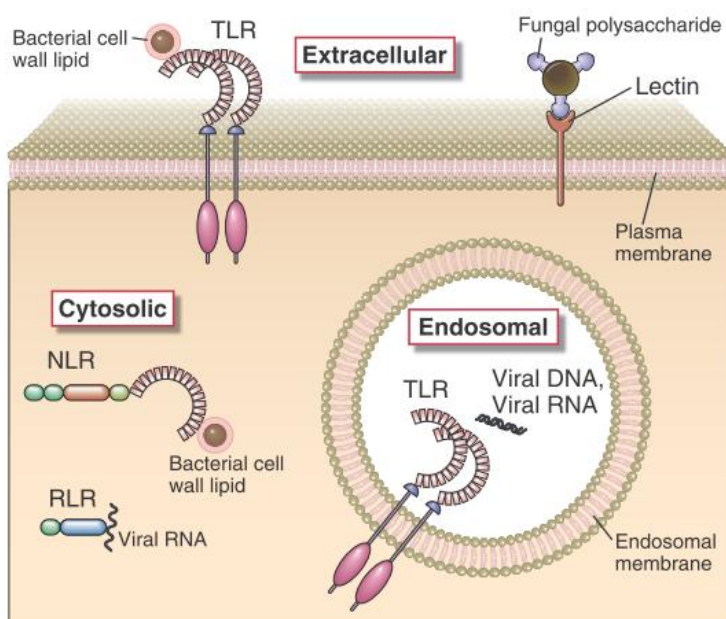


Figure n°2 : Différents récepteurs extra et intracellulaires permettant la reconnaissance des signaux de danger

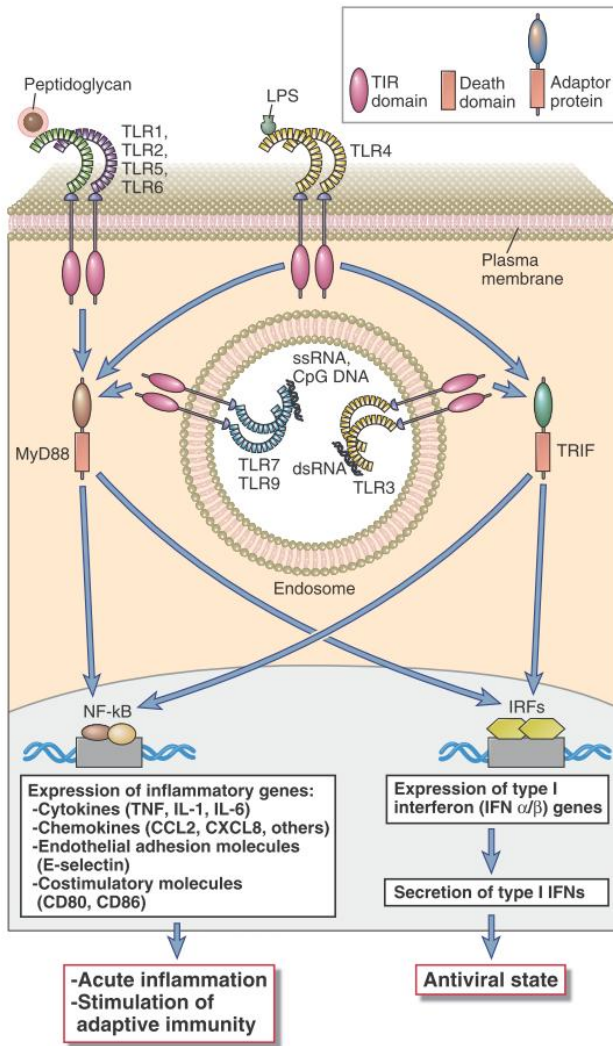


Figure n° 3 : Cibles reconnues par les différents récepteurs des signaux de danger, leurs principales voies de signalisation intracellulaire et leurs principaux effets.

1b- La réponse adaptative :

Associée à la réponse innée, il existe une **réponse immune « adaptative »** permettant d'améliorer l'efficacité de la réponse innée anti-infectieuse et anti-tumorale, et de mettre en place une réponse mémoire efficace (en cas notamment de réinfection par un pathogène déjà connu). Cette réponse est assurée par les lymphocytes B et T, et est caractérisée par : (i) son temps plus long de mise en place, (ii) sa spécificité aux différents pathogènes rencontrés lui permettant ainsi d'être optimale, et (iii) par conséquent sa grande diversité liée à la multitude de pathogènes potentiels.

Pour assurer la réponse adaptative, les lymphocytes, contrairement aux cellules de l'immunité innée, sont caractérisés par l'expression à leur surface d'un récepteur spécifique d'un antigène donné. Dès lors, la réponse adaptative est basée sur :

1/ la reconnaissance spécifique de l'antigène

2/ l'activation lymphocytaire

3/ la coopération entre les lymphocytes B et T CD4⁺ et les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, afin de mettre en place une réponse optimale

4/ la prolifération et différenciation lymphocytaire B et T

5/ et *in fine* la réalisation des fonctions effectrices des lymphocytes B (sécrétion d'anticorps de haute affinité dirigés contre l'antigène), des T CD4⁺ (sécrétion de cytokines régulant la réponse immunitaire) et des T CD8⁺ (cytotoxicité aboutissant à la destruction des cellules infectées ou tumorales). Les principales fonctions effectrices des lymphocytes B, T CD4⁺ et CD8⁺ sont résumées dans la **figure 4**.

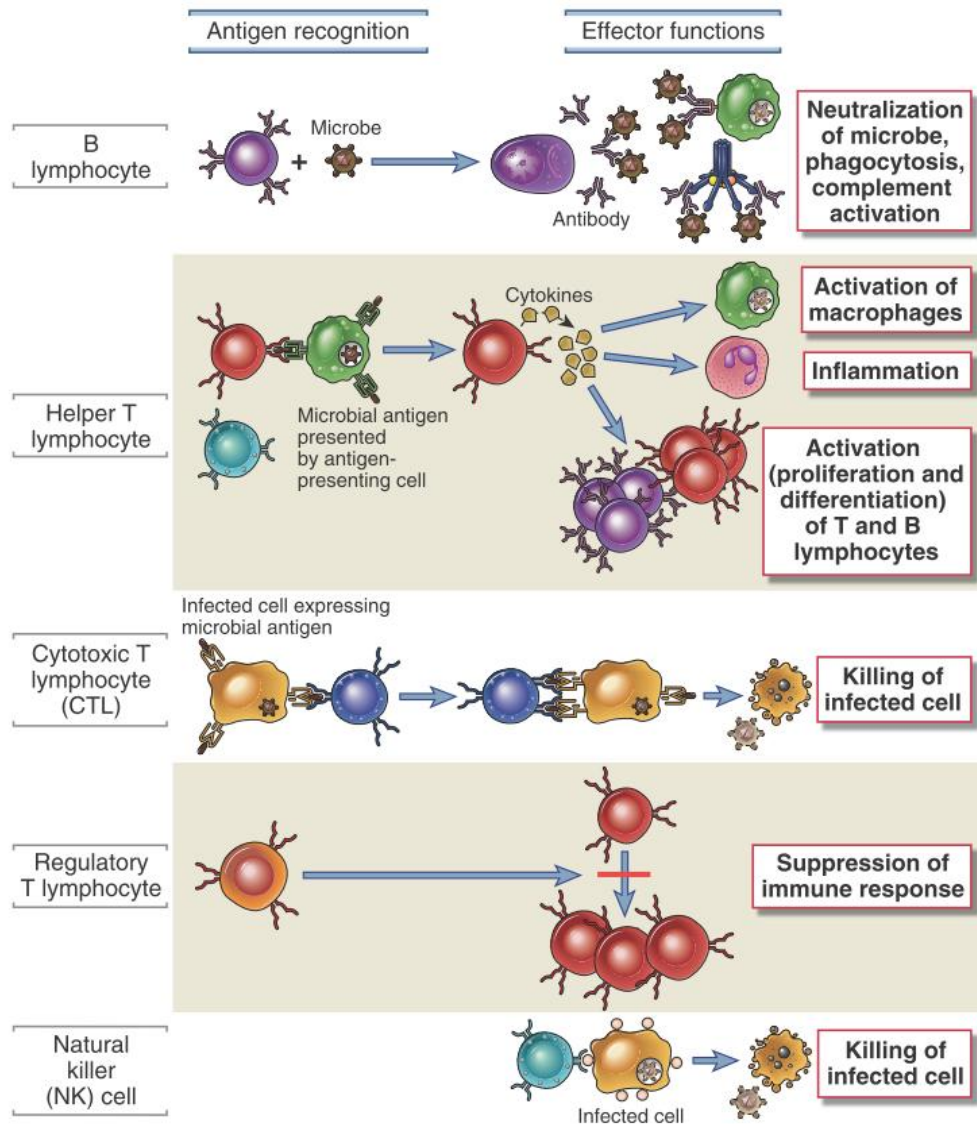


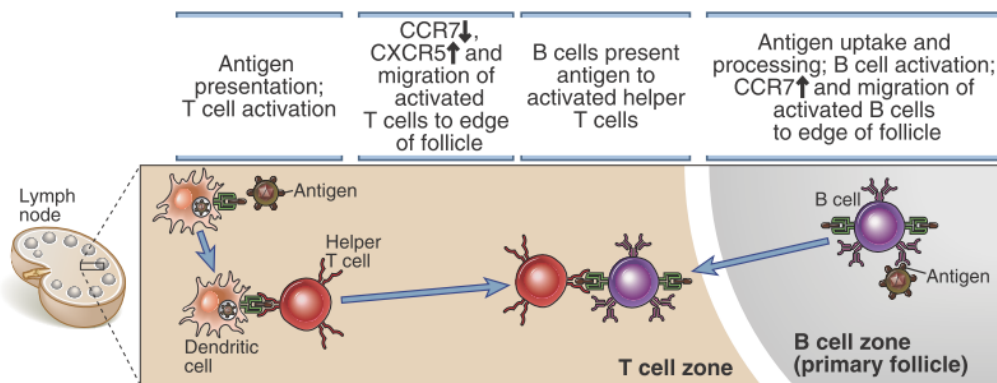
Figure n°4 : Principaux types et fonctions des lymphocytes.

Les principales étapes de la réponse lymphocytaire sont détaillées ci-dessous.

Reconnaissance de l'antigène et activation lymphocytaire

La réponse adaptative est initiée au niveau du ganglion afférent par la réponse innée. Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), notamment les cellules dendritiques, une fois le pathogène reconnu, présentent le peptide aux lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de ce peptide via les interactions entre le TCR du lymphocyte T et le complexe Ag-molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II présent à la surface de la CPA. La reconnaissance de l'antigène par le TCR (signal 1) n'est efficace que si elle s'accompagne en parallèle d'une interaction entre les différentes molécules de co-stimulation présentes à la fois sur le lymphocyte T et sur la CPA (signal 2). L'association de ces différents signaux de stimulation aboutit à l'activation du lymphocyte T CD4⁺ (entraînant une surexpression des molécules de co-stimulation et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires), la différenciation lymphocytaire et l'expansion clonale du lymphocyte T activé. Une fois activé, le lymphocyte T acquiert l'expression de CXCR5 (ligand de CXCL13 sécrété par les cellules dendritiques folliculaires en zone B) et perd celle de CCR7 (ligand de CCL19 et CCL21 sécrétés par les cellules stromales en zone T), permettant sa migration dans la zone B-T et ainsi la coopération B/T (**Figure 5**).

L'activation du lymphocyte B se fait grâce à la reconnaissance par le BCR (*B-cell receptor*) de l'antigène dans sa conformation « native », qui peut être aussi fixé par le complément C3d se liant alors à son propre récepteur le CD21 (=CR2) situé à la surface du lymphocyte B, ou qui peut directement être reconnu par un récepteur TLR. L'ensemble de ces signaux synergiques permet d'aboutir à la prolifération et la différenciation lymphocytaire B.

**Figure n°5:**

Migration
lymphocytaire B et
coopération B et T.

Coopération lymphocytaire B et T, différenciation lymphocytaire et phase effectrice

Une fois activé, le lymphocyte B internalise l'antigène et en présente les peptides à sa surface via les molécules CMH-II, et exprime à sa surface le CD40, comme molécule de co-stimulation, permettant ainsi sa coopération avec le lymphocyte T (**Figure 6**). En effet, le lymphocyte B activé migre dans la zone T et peut ainsi interagir avec le lymphocyte T CD4⁺ activé et spécifique du même antigène, via les liaisons TCR/Ag-CMH-II et les molécules de co-stimulation CD40-CD40L. La coopération B-T a pour conséquence¹ :

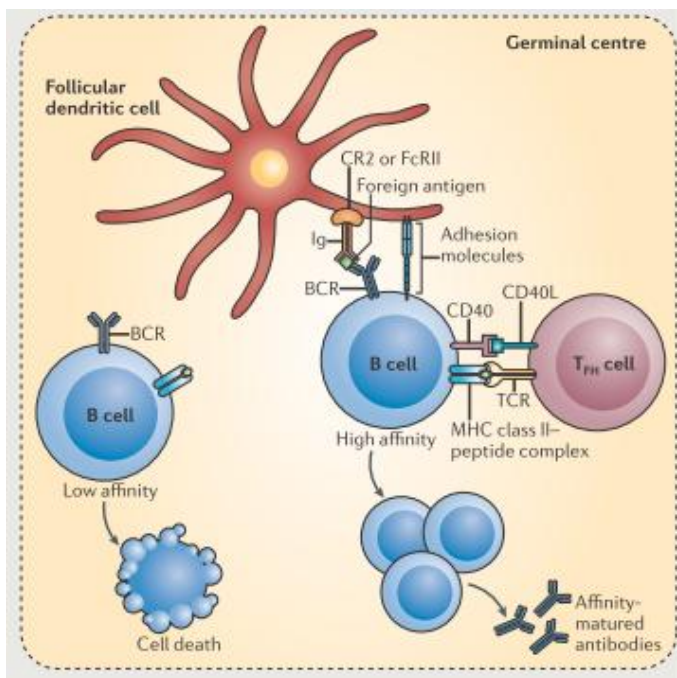


Figure n°6 : Interactions lymphocytaires B et T, aboutissant à la sécrétion d'anticorps dirigés contre l'antigène.

-la prolifération clonale lymphocytaire B et T

-la différenciation finale des lymphocytes T CD4⁺, notamment en « T Follicular Helper » (TFH) au sein des follicules lymphoïdes pour certains d'entre eux. Ils expriment alors fortement CXCR5 (récepteur de la chimiokine CXCL13 fortement sécrétée dans les follicules lymphoïdes) à leur surface.

-la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) du lymphocyte B. En fonction du contexte (type de pathogène, localisation, environnement cytokinique...), l'Ig de chaque lymphocyte se modifie en IgG, IgA ou IgE, avec des propriétés bien distinctes (activation notamment de différents types cellulaires).

-les mutations somatiques des Ig permettant ainsi d'améliorer l'affinité des Ig pour l'antigène rencontré et optimisant ainsi la réponse adaptative. L'anticorps ainsi sécrété et complexé à l'antigène reconnu se fixe au récepteur du fragment constant (Fc) des immunoglobulines à la surface des cellules phagocytaires et active le complément aboutissant à destruction du pathogène.

Au total, la reconnaissance de l'antigène et la coopération entre lymphocytes et cellules dendritiques aboutissent à l'activation et la différenciation en lymphocytes matures ayant des propriétés bien spécifiques. Les différentes voies de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ sont ainsi détaillées dans le paragraphe suivant.

1c- La différenciation lymphocytaire T CD4 :

Généralités sur les réponses Th1, Th2, Th17, Th9, Th22

En fonction du type de pathogène et de l'environnement cytokinique, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs et, de ce fait la nature de la réponse adaptative, varient (**Figure 7**).

En effet, les microorganismes intracellulaires notamment viraux, induisent volontiers une **polarisation Th1**, grâce à la sécrétion d'IFN γ et d'IL-12 par les cellules de l'immunité innée.

Les lymphocytes Th1 sont caractérisés par l'activation de voies de signalisation menant à la surexpression de STAT-4 et du facteur de transcription T-BET, à l'origine de la différenciation

en Th1. Les Th1 induits, par leurs interactions avec les macrophages, favorisent la phagocytose et la destruction intracellulaire des pathogènes, grâce à la sécrétion d'IFN γ et à l'interaction des molécules de co-stimulation (CD40-CD40L). La sécrétion d'IFN γ favorise également la sécrétion d'IgG par les plasmocytes (et inhibe la sécrétion d'IgE) optimisant ainsi la phagocytose du pathogène opsonisé.

Au contraire, **la polarisation Th2** est volontiers induite par une infection de type parasitaire et mène à la sécrétion d'IL-4 favorisant la commutation isotypique en IgE. La réponse Th2 aboutit à la dégranulation des mastocytes et à la sécrétion d'IL-13 et d'IL-5 activant les éosinophiles. L'IL-4 et l'IL-13 inhibent l'activation macrophagique induite par l'IFN γ . Les lymphocytes Th2 sont caractérisés par la surexpression de STAT-6 et du facteur de transcription GATA3 qui promeuvent la polarisation Th2. Les cytokines favorisant une réponse Th2 sont l'IL-25, TSLP et IL-33. Les caractéristiques de l'IL-33 seront abordées plus en détail ultérieurement.

Enfin, les organismes extracellulaires, type bactéries ou champignons, induisent volontiers **une polarisation Th17**, via la sécrétion conjointe d'IL-6 et de TGF- β . L'IL-23, est également essentielle pour l'induction et le maintien du phénotype Th-17. L'IL-23 induit l'activation des lymphocytes Th17 et la sécrétion d'IL-17, IL-22, IL-6^{2,3}. L'IL-23 est devenue une cible thérapeutique majeure dans le psoriasis, la maladie de Crohn, la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde, maladies pour lesquelles de nombreux anticorps anti-IL-23 ont été développés. Les lymphocytes Th17 induisent une sécrétion d'IL-17, conduisant au recrutement et à l'activation des PNN et à la production de peptides antimicrobiens. Les Th17 induiraient également la sécrétion d'IL-22 permettant de maintenir l'intégrité des barrières épithéliales, et seraient associés à la sécrétion d'IL-21, qui favoriserait la prolifération et les fonctions effectrices des CD8⁺ et des NK. Les lymphocytes Th17 acquièrent leur phénotype grâce la surexpression de ROR γ t et de STAT3.

Les cellules Th9 (*T helper 9*) sont des lymphocytes T CD4⁺ caractérisés par la production d'IL-9. La différenciation en lymphocytes Th9 requiert les signaux IL-2/STAT-5 et IL-4/STAT-6 ainsi que l'activation par le TGF- β qui permet la différenciation des Th2 en Th9. Le TSLP permettrait d'augmenter la production d'IL-9, ainsi que l'IL-25 et l'IL-33⁴. La sécrétion d'IL-9 est dépendante d'un facteur de transcription spécifique BATF. Les Th9 ont été récemment mis en évidence, expliquant que leurs rôles soient encore mal connus. Cependant, certaines études ont déjà montré leur rôle dans la défense anti-parasitaire (contre les helminthes) et dans certaines maladies autoimmunes comme la polyarthrite rhumatoïde et certaines vascularites comme l'artérite à cellules géantes⁵.

Enfin, les **lymphocytes Th22** ont récemment été mis en évidence. Ils sont caractérisés par la sécrétion d'IL-22, et d'IL-13 sans production d'IFN γ ni d'IL-17. Ils sont induits par la sécrétion de TNF α et d'IL-6 et leur différenciation nécessite l'activation des facteurs de transcription aryl hydrocarbon receptor (ARH) et ROR γ t. Les lymphocytes Th22 participent à l'immunité des barrières et aux mécanismes de réparation tissulaire^{6,7}. Ils ont été impliqués dans certaines maladies cutanées comme les dermatites atopiques ou certaines maladies autoimmunes (psoriasis, lupus, sclérose en plaques..) ⁷.

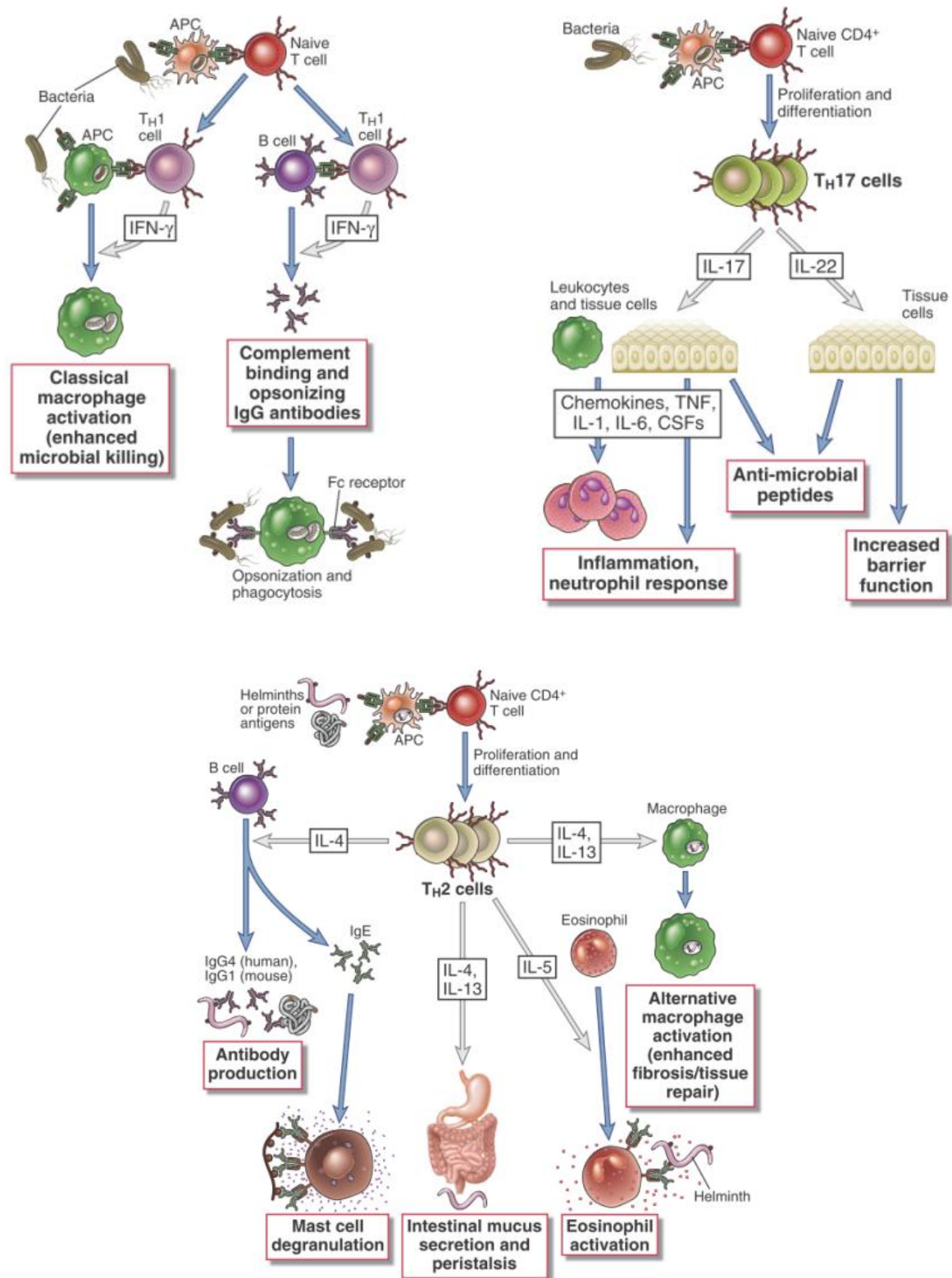


Figure n°7 : Fonctions des différents types de réponse lymphocytaire Th1, Th2 et Th17.

Les lymphocytes T folliculaires *helper*

Biologie et différenciation des lymphocytes T folliculaires *helper*

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les lymphocytes naïfs peuvent également se différencier, au sein des ganglions, en lymphocytes **T folliculaires *helper* (Tfh)** ayant des propriétés fonctionnelles bien distinctes. Ils sont caractérisés par l'expression membranaire de CXCR5, ICOS, PD-1 et la sécrétion de l'IL-21. Leur présence est essentielle à la formation des centres germinatifs et à la maturation des lymphocytes B en plasmocytes et lymphocytes mémoires. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Tfh matures requiert de multiples interactions avec les cellules dendritiques, l'antigène et les lymphocytes B. Dans ce sens, l'interaction ICOS-ICOSL serait importante pour la différenciation en Tfh. De même, SAP (*SLAM-associated protein*), activant le facteur de transcription BCL6, est également nécessaire à la différenciation en Tfh. Les cytokines et mécanismes exacts intervenant dans la différenciation en Tfh ne sont pas encore parfaitement élucidés. L'IL-6, l'IL-21 et l'IL-27 participent à la différenciation en Tfh via l'activation de STAT-3 qui induit l'expression de BCL6, MAF, BATF et IRF-4, nécessaires à l'expression de CXCR5, PD-1 et ICOS qui sont des marqueurs des Tfh. La **figure 8** résume les différentes voies de régulation de différenciation des Tfh. Des études récentes ont montré chez l'homme un rôle très important de l'IL-12 qui induirait une expression accrue d'IL-21, ICOS, CXCR5 et BCL6^{8,9}. Le TGF- β , en coopération avec l'IL-12 et l'IL-23 (et d'autres cytokines activant STAT3), favoriserait l'expression de marqueurs essentiels aux Tfh comme l'IL-21, CXCR5 et BCL6 par les T CD4⁺ naïfs¹⁰. Au contraire, la différenciation en Tfh est inhibée par *B lymphocyte induced maturation protein 1* (BLIMP-1), induite par IL-2/ STAT5 et inhibant l'expression de BCL6. De la même façon, l'IL-10 empêche la formation de Tfh. L'ensemble des signaux régulant la différenciation en Tfh sont indiqués dans la **Figure 8**¹.

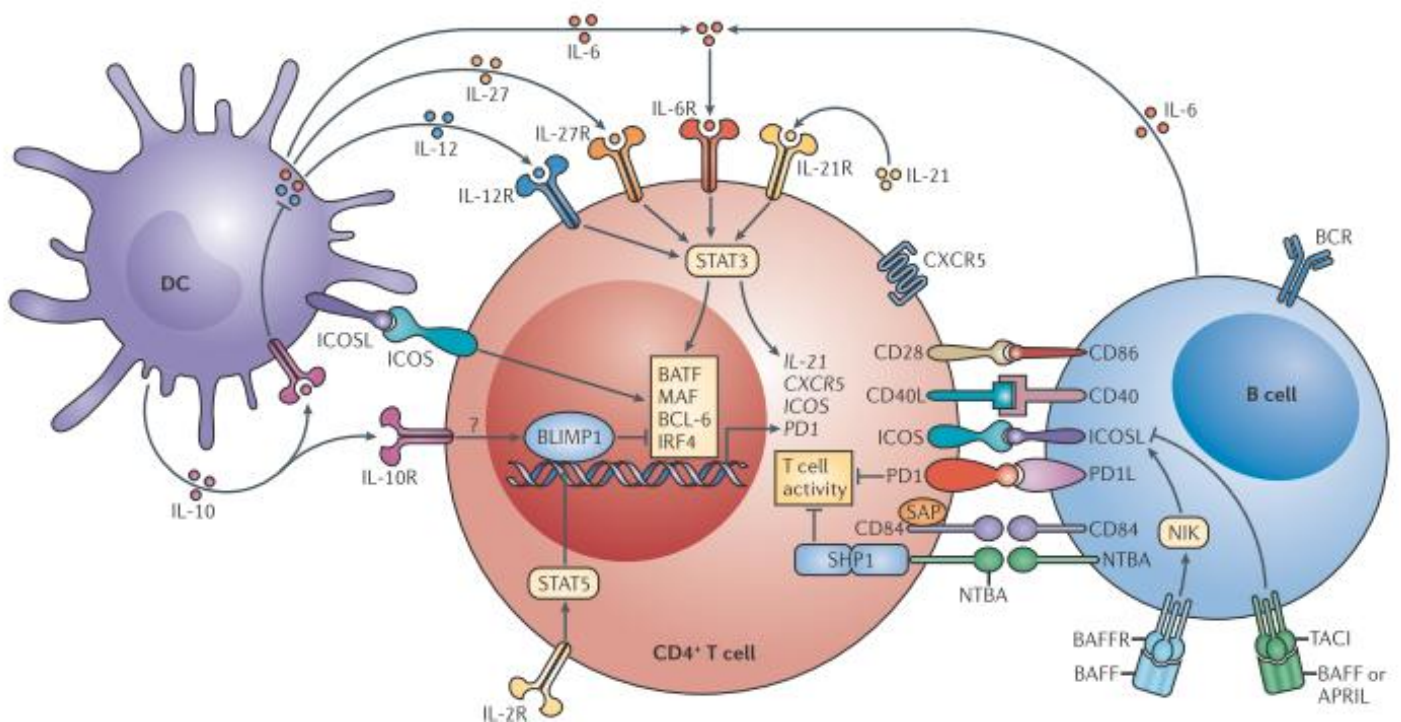


Figure n°8 : Différents signaux intervenant dans la différenciation lymphocytaire Tfh¹.

Comme évoqué précédemment, les Tfh sont essentiels à la différenciation lymphocytaire B, leur commutation isotypique et la formation des centres germinatifs. Ces processus sont dépendants de l'IL-21 et de nombreuses interactions entre les lymphocytes B et T comme CD40-CD40L, ICOS-ICOSL, CD28/CD80-86 (**Figure 8**).

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence dans le sang des lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺, correspondant à une sous-population de CD4⁺ ayant des propriétés fonctionnelles spécifiques proches de celles des Tfh des centres germinatifs. En effet, certaines études ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ circulants (Tfhc) avaient une capacité accrue d'induire la commutation isotypique des lymphocytes B ainsi que leur différenciation en plasmocytes^{11,12}. Les Tfhc ont un phénotype différent des Tfh des centres germinatifs car ils

n'expriment pas BCL6. Les mécanismes grâce auxquels les Tfhc maintiennent leur différenciation sont pour le moment inconnus.

Cette population, a été plus finement caractérisée en différenciant les Tfhc en Tfh1 (CXCR3⁺, CCR6⁻) ayant un profil proche des Th1 (sécrétion d'IFN γ), les Tfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻) proches des Th2 et les Tfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺) proches des Th17 ^{8,11,13}. Les Tfh17 et Tfh2 ont une capacité accrue d'induire une sécrétion d'Ig par les lymphocytes B alors que les Tfh1 ne le permettraient pas ¹¹. Les Tfh17 induiraient la sécrétion d'IgG et IgA alors que les Tfh2 induiraient plutôt une sécrétion d'IgE et IgG. L'expression différentielle de CCR7, ICOS et PD-1 permet également de distinguer plusieurs sous-types de populations : les Tfhc activés (ICOS⁺PD-1⁺⁺CCR7^{low}) et les Tfhc quiescents (ICOS⁻PD-1⁺CCR7^{int} et ICOS⁻PD-1⁻CCR7^{hi}). Seule une minorité des Tfhc expriment ICOS chez le sujet sain mais cette population peut augmenter après une vaccination. L'expression différentielle de ces marqueurs permet donc de définir des sous-populations de Tfh avec des phénotypes et fonctionnalités distincts, notamment une capacité plus ou moins importante à aider les lymphocytes B mémoires ou naïfs à sécréter des Ig.

Lymphocytes Tfh en pathologie

Dans nombre de maladies autoimmunes (lupus, syndrome de Gougerot-Sjögren, polyarthrite rhumatoïde, myasthénie), des études ont montré une association entre la fréquence des Tfhc ICOS⁺ et PD-1⁺ et la sévérité de la maladie et le titre sérique d'auto-anticorps¹⁴⁻¹⁶. Plusieurs études récentes ont également montré dans les maladies autoimmunes une fréquence accrue de Tfh2 et Tfh17 alors que les Tfh1 seraient sous-représentés⁸ (**figure 9**). Ces anomalies seraient corrélées avec l'activité de la maladie, le titre d'auto-anticorps et la fréquence des plasmablastes périphériques ^{11,17}. Ces données suggèrent dans ces maladies une efficacité accrue des Tfh qui favoriseraient ainsi la synthèse d'auto-anticorps.

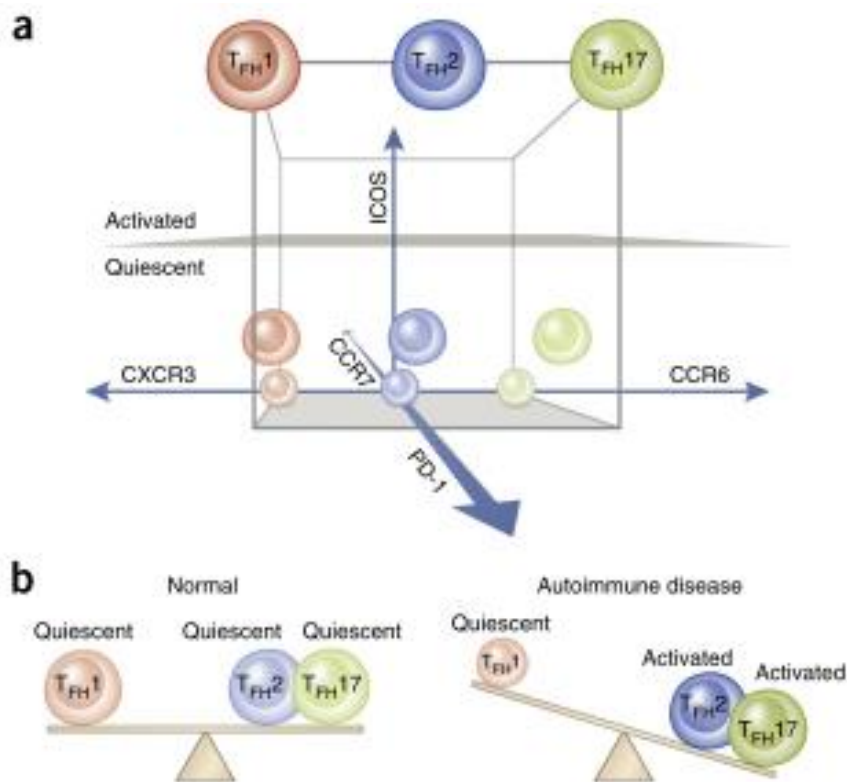


Figure n°9 : Phénotype des lymphocytes Tfh1, 2 et 17⁸

Les lymphocytes Tfh sont également particulièrement intéressants au cours des vaccinations. En effet, une meilleure connaissance du mécanisme de production d'anticorps neutralisants est un enjeu majeur pour améliorer l'efficacité vaccinale. La quantification de la réponse immune circulante liée aux Tfh après vaccination pourrait apporter des marqueurs prédictifs de bonne réponse à la vaccination. A titre d'exemple, certaines études ont montré après vaccination contre le virus grippal H1N1 une corrélation entre la réponse vaccinale et les taux circulants d'IL-21, de lymphocytes CD4⁺ CXCR5⁺ et de lymphocytes B mémoires¹⁸⁻²⁰. Dans les infections chroniques comme le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), il a été montré une augmentation des Tfh composés d'une forte proportion de CD4⁺ spécifiques du VIH^{21,22}. Le nombre de Tfh et de plasmocytes diminuait sous traitement antirétroviral, suggérant fortement que la réponse humorale inadaptée est liée à l'infection par le VIH.

Pour conclure, la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ est un élément majeur de la réponse lymphocytaire effectrice, permettant ainsi d'orchestrer les réponses lymphocytaires B, CD8⁺ mais également la réponse innée. Cependant, toute réponse effectrice efficace repose également sur une réponse régulatrice efficace, et notamment sur les lymphocytes T régulateurs.

1d-La réponse régulatrice :

Généralités sur les mécanismes d'immunorégulation

Une réponse immune efficace repose sur des systèmes de régulation efficaces capables de prévenir la survenue d'une réponse immune inadaptée et/ou excessive.

Le contrôle de la réponse immune repose sur :

- la mise en place d'une tolérance efficace centrale et périphérique visant à éviter la présence de lymphocytes B et T auto-réactifs.

- un rétrocontrôle négatif (« *feedback* ») de toute réponse immune physiologique, via la mise en place de signaux inhibiteurs, comme la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (l'IL-10 par exemple) par les cellules immunitaires activées ou le phénomène d'« *exhaustion* » des cellules immunitaires après leur activation, entraînant l'expression de récepteurs inhibiteurs empêchant ainsi leur activation ultérieure (exemple d'« *exhaustion* » des lymphocytes T CD8+ lors d'une infection virale chronique comme le VIH).

- la nécessité de plusieurs signaux de co-stimulation pour toute activation lymphocytaire T ou B.

Brièvement, la **tolérance centrale** des lymphocytes T est mise en place dans le thymus. La présentation par les cellules dendritiques des antigènes du soi aux thymocytes aboutit à la délétion clonale (**sélection négative**) ou à l'induction de lymphocytes T régulateurs des thymocytes porteurs d'un TCR ayant une affinité trop forte pour l'antigène du soi présenté. La tolérance centrale des lymphocytes B est assurée au niveau de la moelle osseuse. Les lymphocytes B reconnaissant les antigènes du soi avec une trop grande affinité peuvent : (i) initier un nouveau réarrangement du segment VJ de la chaîne légère de leur immunoglobuline via l'activation de RAG1 et RAG2, aboutissant ainsi à l'expression d'un nouveau BCR non auto-

réactif (« **receptor editing** ») (ii) entrer en apoptose si l'« *editing* » du BCR n'a pas fonctionné (**délétion clonale**) ou (iii) devenir anergique (non fonctionnel), via l'inhibition des voies de signalisation du BCR en cas de lymphocyte B auto-réactif ayant une faible affinité pour l'auto-antigène reconnu.

En **périphérie**, la tolérance repose en grande partie sur les lymphocytes T régulateurs (Treg) que nous détaillerons dans le paragraphe suivant. Comme évoqué en début de paragraphe, il existe également d'autres mécanismes visant à réguler la réponse immune. Les lymphocytes B auto-réactifs peuvent entrer en apoptose, ou devenir anergiques à cause de stimulations répétées avec l'autoantigène du fait d'une plus grande dépendance à BAFF (facteur de croissance et survie des lymphocytes B). Des lymphocytes B ou T auto-réactifs ne déclencheront pas de réponse immune en l'absence de 2èmes signaux d'activation (molécules de co-stimulation CD80/86 ou cytokines activatrices). Les cellules immunes (cellules dendritiques et lymphocytes) peuvent exprimer des corécepteurs inhibiteurs (ex CD22, CTLA4, PD-1/PD1L) inhibant l'activation du lymphocyte T ou B auto-réactif, devenant ainsi anergique.

Lymphocytes T régulateurs

Les Treg représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4⁺ périphériques. Les Treg périphériques sont définis par l'expression du facteur de transcription FOXP3, une forte expression du récepteur α de l'IL-2 (CD25) et une faible expression de CD127. La majorité d'entre eux expriment le CTLA-4 et le GITR (*glucocorticoid induced TNFR*). Ils sont caractérisés par la sécrétion de TGF- β et d'IL-10²³. La prolifération, la stabilité et la survie des Treg est en partie dépendante de l'IL-2.

On distingue les Treg naturels ou thymiques, et les Treg induits. Hélios permettrait de distinguer ces sous-populations dans la mesure où ce facteur de transcription est fortement exprimé dans les

Treg thymiques²⁴. Cependant, une autre étude a rapporté la coexistence de cellules Helios négatives et positives au sein de Treg naturels (définis par un profil phénotypique naïf)²⁵. La différenciation des Treg au niveau thymique est dépendante du signal induit par le TCR. En effet, l'interaction entre un auto-antigène et le TCR d'affinité intermédiaire induit la différenciation en Treg, alors qu'une interaction de haute affinité conduit à l'apoptose du lymphocyte T. En périphérie, la différenciation en « Treg induit » nécessite l'interaction du lymphocyte T conventionnel avec une CPA tolérogène, induisant des signaux inhibiteurs via notamment le TGF- β et l'acide rétinoïque.

La maturation des Treg et la régulation de leurs fonctions suppressives sont dépendantes de plusieurs facteurs. La forte expression de FOXP3 est indispensable pour le maintien des fonctions immunomodulatrices des Treg en périphérie, à savoir la surexpression des gènes suppresseurs et l'up-régulation du CD25²⁶. FOXP3 ne semble pas indispensable à la différenciation des Treg au niveau thymique²⁷. La notion de stabilité de FOXP3 est également un élément majeur. Les signaux inducteurs et « déstabilisateurs » de l'expression de FOXP3 sont présentés dans la **Figure 10**.²⁸

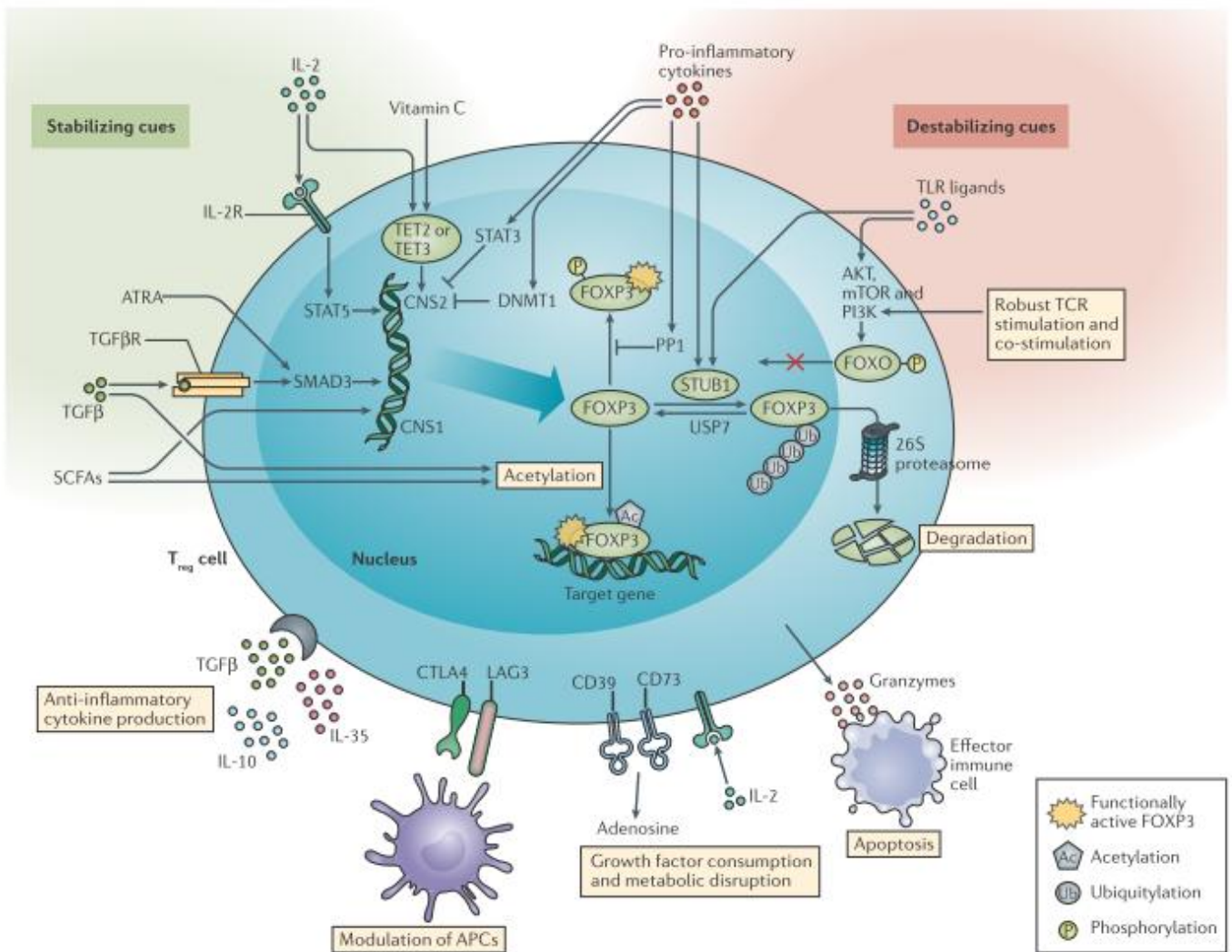


Figure n°10 : Signaux stabilisateurs et déstabilisateurs du facteur FOXP3 dans les lymphocytes T régulateurs²⁸

Par ailleurs, HELIOS et GATA-3 sont également des facteurs de transcription importants pour le maintien des fonctions suppressives des Treg²⁹⁻³¹. *A contrario*, les fonctions suppressives des Treg semblent être inhibées par les voies de signalisation induites par les récepteurs NOTCH³².

Récemment, Komatsu et al, ont démontré la notion de plasticité des Treg FOXP3⁺ dans un modèle murin d'arthrites autoimmunes. Ils ont rapporté la perte d'expression de FOXP3 chez certains Treg et l'acquisition d'un phénotype Th17, via la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes³³.

En plus de la plasticité des Treg, des études récentes mettent en lumière l'hétérogénéité de cette

population. Une étude a montré l'existence d'une population Treg exprimant le facteur de transcription T-BET, stable au cours du temps et même après une infection. Ils se sont révélés avoir un rôle majeur dans la régulation de la réponse Th1 et la suppression de la sous-population Treg T-BET⁺ aboutissait à une réponse autoimmune de type Th1³⁴. De façon intéressante, la suppression des Treg T-BET⁻ conduisait à une surproduction de cytokines Th17 et Th2 mais à une diminution d'IFN γ .³⁵

Les Treg ont des fonctions suppressives très puissantes. Le schéma ci-dessous (**Figure 11**) résume les principaux mécanismes suppresseurs par lesquels les Treg assument leurs fonctions :

- induction d'expression de récepteurs inhibiteurs par les cellules dendritiques
- apoptose et mort cellulaires des cellules activatrices (via perforine/granzyme B)
- expression de signaux inhibiteurs : interaction CTLA4/CD80 ou CD86, aboutissant à la sécrétion d'IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*). L'IDO est une enzyme dégradant les tryptophanes, menant à la synthèse de kynurénines, induisant l'anergie et l'apoptose des lymphocytes activateurs et inhibant l'expression des récepteurs activateurs.
- sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF β)
- privation du milieu en IL-2, nécessaire à l'activation et la prolifération des T effecteurs par une plus grande affinité pour cette cytokine que les T effecteurs.

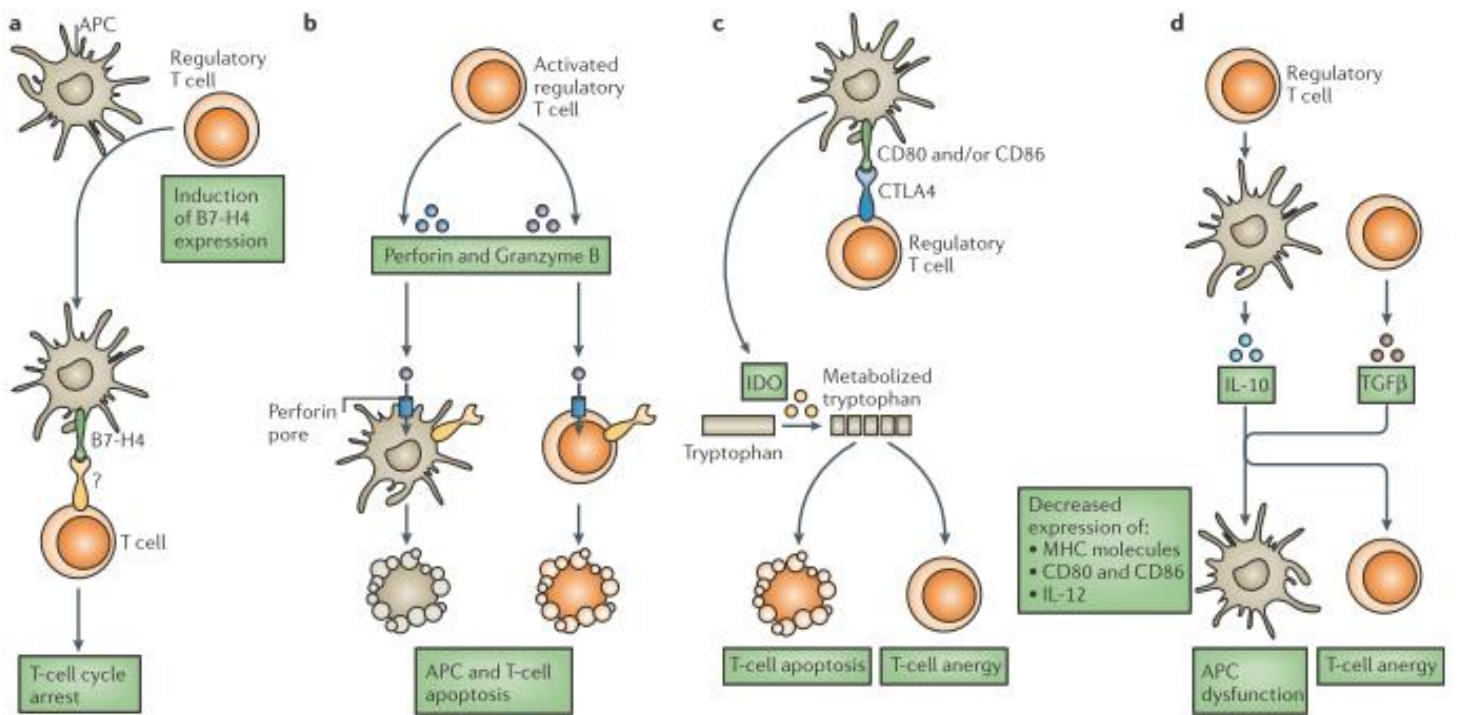


Figure n°11 : Principaux mécanismes suppresseurs des lymphocytes T régulateurs ³⁶

2- IL-33, cytokine de la famille IL-1 :

Comme nous l'avons abordé précédemment, de nombreuses cytokines interviennent dans la régulation de la réponse immune. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'IL-33.

Généralités sur la famille de l'IL-1

La famille de l'IL-1 comprend 7 cytokines agonistes (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ), 3 récepteurs antagonistes (IL-1RA, IL-36RA et IL-38) et une cytokine dite « anti-inflammatoire » l'IL-37. Les récepteurs membranaires auxquels les cytokines de la famille de l'IL-1 se fixent sont indiqués sur le schéma suivant (**Figure 12**)³⁷. Les récepteurs membranaires des cytokines de la famille IL-1 sont caractérisés par un domaine extracellulaire comprenant 3 domaines « Ig-like » excepté pour l'IL-18BP et TIR8. Les domaines intracellulaires comprennent un domaine TIR, induisant la voie de signalisation MYD88. Enfin, la liaison de chaque cytokine de cette famille nécessite la formation d'un complexe de leur récepteur avec une protéine accessoire (pour IL-1, IL-33 et IL-36) ou de ses chaînes α et β pour transduire un signal.

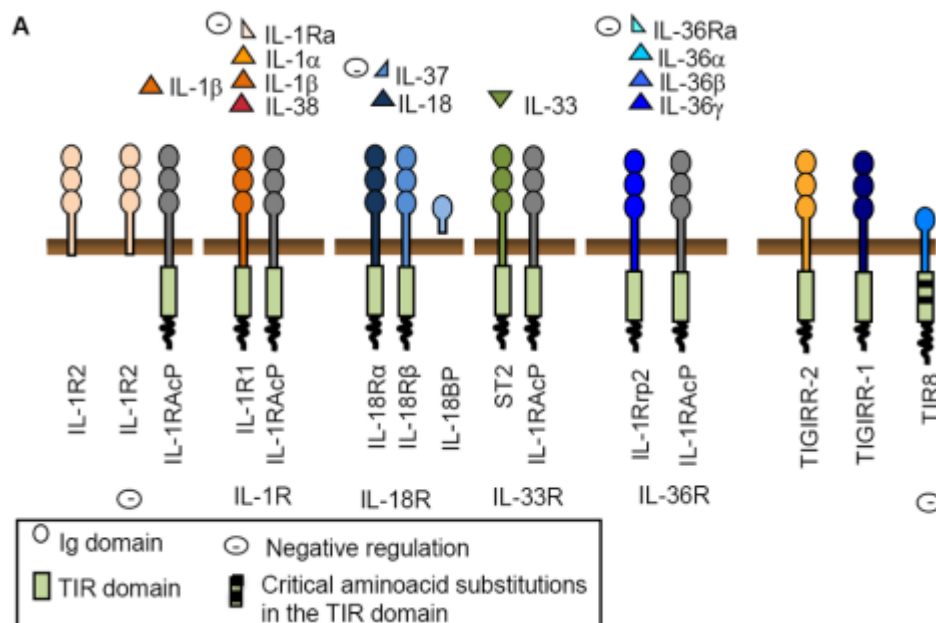


Figure n°12 : Cytokines de la famille IL-1 et leurs récepteurs³⁸

IL-33 : expression, modes d'action et régulation

L'IL-33 est constitutivement exprimée dans le noyau des cellules épithéliales, endothéliales, kératinocytes, et aussi mésenchymateuses (fibroblastes, cellules musculaires lisses). A l'état d'équilibre, l'IL-33 est intranucléaire, grâce à sa portion N-terminale comportant une région de liaison à la chromatine (via les histones H2A/H2B). L'IL-33 pourrait réguler la transcription de certains gènes mais ce rôle est à l'heure actuelle mal connu. Elle n'est sécrétée qu'en cas d'apoptose et nécrose cellulaire ³⁹. Contrairement à l'IL-1 et l'IL-18, l'IL-33 ne doit pas être clivée par la caspase 1 pour être biologiquement active. Son activité biologique ne dépend donc pas de l'activation de l'inflammasome. En revanche, lorsqu'elle est libérée par apoptose, l'IL-33 est clivée par les caspases 3 et 7, ce qui diminue son activité cytokinique et la rend sensible à sa dégradation par les protéases. En cas de nécrose, elle agit alors comme une véritable cytokine, en se liant à son récepteur, appelé ST2 ou IL1-R4, exprimé de façon constitutive par les cardiomyocytes, et nombre de cellules immunitaires comme les lymphocytes Th2, ILC2, NK, macrophages M2, mastocytes, éosinophiles, basophiles et les lymphocytes T régulateurs exprimant GATA3 ⁴⁰. ST2 a 2 isoformes principales : ST2 membranaire et ST2 soluble. Ces isoformes représentent deux variants issus d'un même transcrit qui dépendraient du promoteur mis en jeu, le promoteur distal aboutissant au ST2 membranaire contenant l'exon 1a de 15Kb et le promoteur proximal résultant en la synthèse de ST2 soluble ne contenant pas cet exon ⁴¹. Le récepteur ST2 soluble ne contient donc pas le domaine transmembranaire et intra-cytoplasmique que comprend l'isoforme membranaire de ST2. ST2 soluble est produit spontanément dans le poumon, l'intestin, le cœur et par les mastocytes activés par l'IL-33 ou les lymphocytes Th1 et Th17 activés par anti-CD3/anti-CD28.

L'IL-33 est par conséquent une véritable « alarmine », sécrétée et active uniquement en cas de dommage tissulaire. Son activité biologique peut également être accrue via son clivage par les protéases sécrétées par les PNN ou mastocytes (elastases, cathepsines) en cas d'inflammation ⁴²

(**Figure 13**). Son activité peut au contraire être régulée par des mécanismes variés comme : la présence du récepteur soluble de l'IL33 (ST2 soluble) capable de fixer l'IL-33 et d'en inhiber ses effets, ou l'inhibition de son action par son oxydation par des cystéines qui induisent la formation de ponts disulfures et empêchent sa liaison à son récepteur ST2.

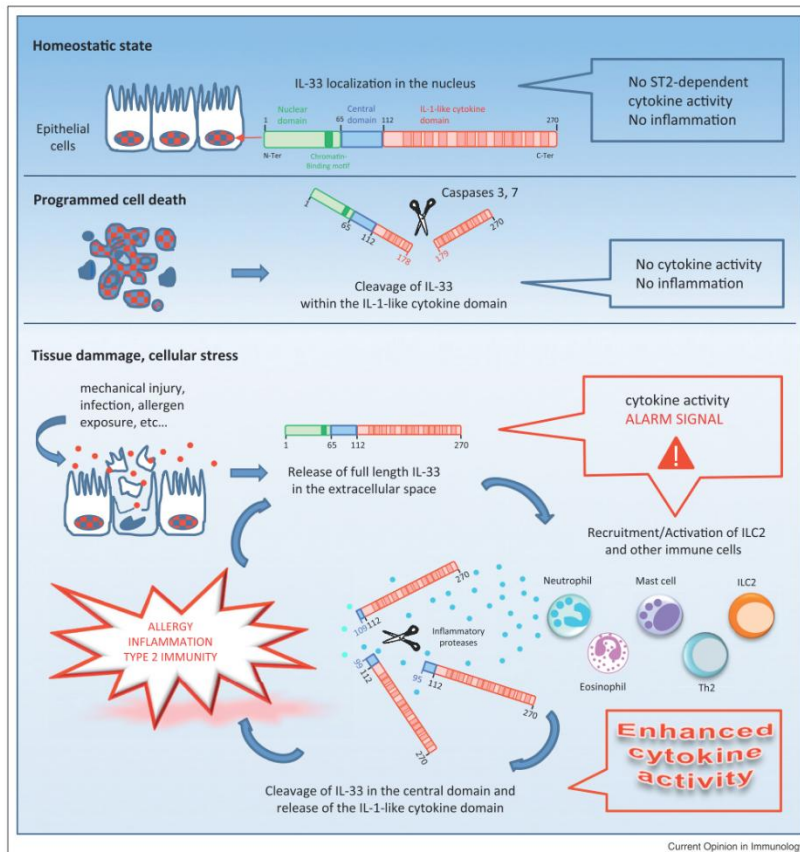


Figure n°13 : IL-33, localisation, sécrétion et modes d'action ⁴²

La liaison de l'IL-33 à son récepteur induit le recrutement de la protéine accessoire IL-1RAcP et l'hétérodimérisation de ST2 à IL-1RAcP. Le déclenchement de la cascade de signalisation requiert à la fois le domaine TIR du récepteur ST2 et celui de la protéine accessoire. Comme pour les autres cytokines de la famille de l'IL-1, la liaison de l'IL-33 entraîne le déclenchement de la voie de signalisation MyD88/IRAK, conduisant *in fine* à l'activation des voies NF-κB et MAP kinases (**Figure 14**) ⁴¹. Le récepteur ST2 est principalement exprimé sur les mastocytes, basophiles, éosinophiles, ILC2 et lymphocytes Th2 et T régulateurs. Les cibles cellulaires de l'IL-33 sont représentées sur la **figure 15**.

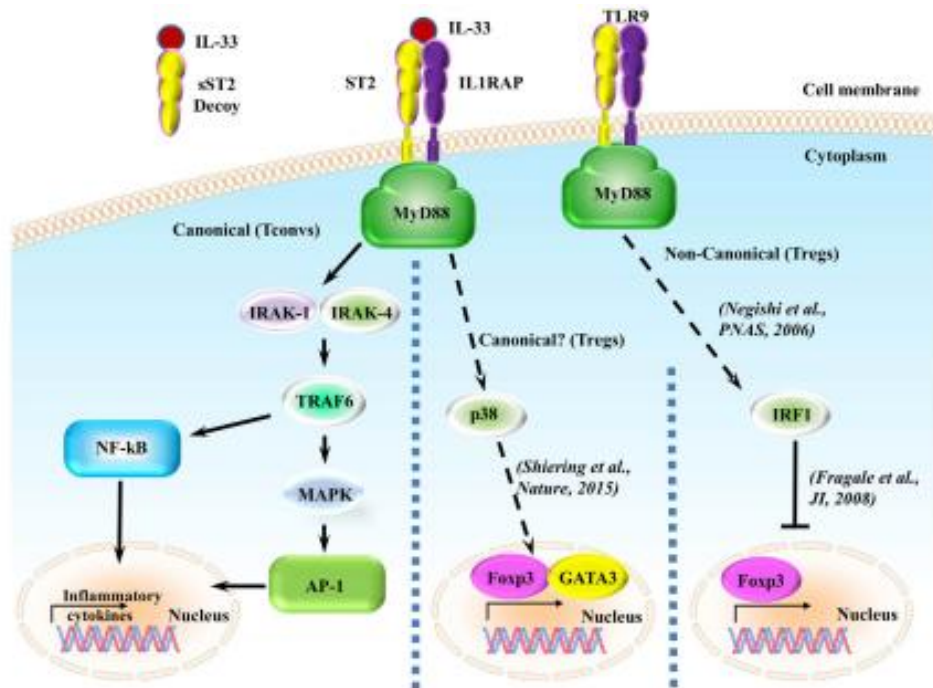
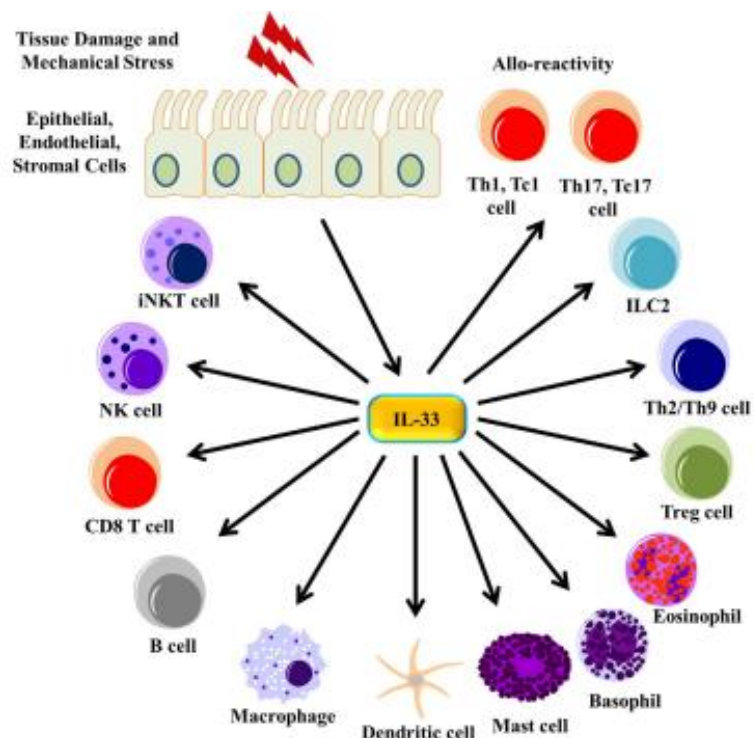


Figure n°14 : Voies d'activation cellulaire induites par la liaison d'IL-33 à son récepteur⁴¹

15 :



Figure

Principales cibles cellulaires de l'IL-33, sécrétée après dommages tissulaires⁴¹

IL-33 : implications physiopathologiques

L'IL-33 favoriserait l'activation endothéliale, l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire, dans des modèles *in vitro* et *in vivo* physiologiques^{43,44}. En revanche, son rôle au niveau vasculaire dans des maladies inflammatoires, notamment les vascularites, n'a pas été étudié jusqu'à présent.

Du fait de l'expression constitutive de ST2 sur les Th2, ILC2, mastocytes, éosinophiles, l'IL-33 est principalement connue pour induire une réponse Th2 et pour être impliquée dans les réactions allergiques (en activant en particulier les mastocytes et éosinophiles)⁴⁵. Elle se distingue alors de l'IL-18, connue principalement pour promouvoir une réponse Th1. Dans les modèles murins d'allergie (notamment induits par la papaïne ou l'ovalbumine), il a été montré que l'IL-33 aggravait l'inflammation des voies respiratoires via la production d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2, l'hyper-éosinophilie et la polarisation Th2^{46,47}. Certaines études ont prouvé le rôle majeur de l'IL-33 sur la croissance, prolifération, maturation, activation et dégranulation des mastocytes. L'IL-33 induirait la production par les mastocytes de cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-6) et Th2 (IL-4 et IL-13)⁴⁸.

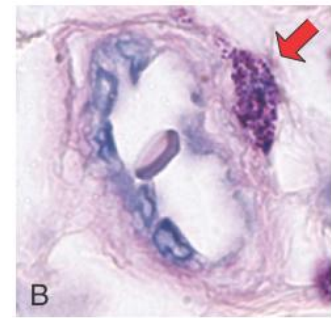
L'IL-33 est impliquée dans nombre de maladies autoimmunes. De nombreuses études ont évalué son implication dans la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques (SEP) et les maladies inflammatoires digestives⁴¹. Néanmoins, les effets de l'IL-33 dans ces maladies semblent complexes et certains résultats peuvent sembler à première vue contradictoires. Dans certains modèles murins d'arthrites induites par le collagène, l'IL-33 recombinante aggravait les symptômes alors que l'inhibition de ST2 atténuait la sévérité de l'arthrite⁴⁹. Xu et al. ont rapporté une aggravation de la polyarthrite après administration d'IL-33, en partie médiée par les mastocytes⁵⁰. *A contrario*, d'autres études ont montré que l'administration d'IL-33 était associée à une augmentation des lymphocytes T régulateurs et Th2 et pouvait empêcher le développement de l'arthrite⁵¹. Dans la SEP et les maladies inflammatoires digestives, des effets contradictoires de l'IL-33, protecteurs ou néfastes, ont également été décrits,³⁹. L'impact de l'IL-33 sur la

régulation de la réponse immune semble particulièrement complexe, en fonction de la maladie, du modèle utilisé et du timing de l'administration. Ses effets dans les maladies inflammatoires et autoimmunes méritent donc d'être précisés.

3-Le mastocyte :

Le mastocyte étant une des principales cibles de l'IL-33, ses fonctions et voies d'activation sont détaillées dans ce paragraphe.

Le mastocyte est impliqué dans de nombreux mécanismes physiopathologiques concernant la régulation de la réponse immune, les phénomènes de perméabilité vasculaire et de



réparation tissulaire. Les mastocytes sont des cellules issues de progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse, qui finissent leur différenciation et acquièrent leur phénotype mature dans les tissus. Ils sont particulièrement présents dans les épithéliums des muqueuses, représentent un des acteurs majeurs de l'immunité innée et constituent ainsi une des premières lignes de défense de l'organisme. A l'état physiologique, ils ne sont pas présents dans le sang périphérique mais sont retrouvés dans les tissus, préférentiellement près des vaisseaux et des nerfs.

Les mastocytes sont caractérisés par la présence de granules intracytoplasmiques contenant de l'histamine, de la tryptase et d'autres médiateurs pro-inflammatoires (leucotriènes, prostaglandines, radicaux libres). Ils sont capables de sécréter également d'autres substances pro-angiogéniques comme le VEGF et l'angiopoïétine. Ils ont la particularité de pouvoir dégranuler et libérer le contenu de leurs granules en quelques minutes. Ils peuvent aussi produire certaines cytokines (Th2, IL-6, TNF α) ou chimiokines. Cependant, ce processus prend plusieurs heures et est majoritairement indépendant des phénomènes de dégranulation⁴⁸. L'activation des mastocytes dépend d'un ensemble de signaux liés à l'environnement et au profil d'expression des récepteurs exprimés à leur surface (à la fois activateurs et inhibiteurs). Des études chez les rongeurs suggèrent l'existence de plusieurs sous-types de mastocytes en fonction du tissu concerné (dans les muqueuses ou dans le stroma), ayant des phénotypes différents. Les mastocytes semblent pouvoir changer de phénotype en fonction de leur localisation, suggérant

une véritable « plasticité » mastocytaire. On peut donc supposer que l'action des mastocytes est très complexe, dépendant du tissu et de l'environnement inflammatoire local ⁴⁸.

Principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs des mastocytes

Les mastocytes expriment à leur surface, de façon constitutive, les récepteurs pour l'IgE (FcR ϵ I de forte affinité), et en fonction de l'environnement cytokinique, le récepteur aux IgG (FcR γ I de forte affinité et FcR γ III de faible affinité). La fixation de ces anticorps à ces récepteurs aboutit alors à l'activation du mastocyte, à sa dégranulation libérant les 3 classes de médiateurs mastocytaires et à la migration mastocytaire. Les voies de signalisation mises en jeu en aval de ces récepteurs sont détaillées dans la figure ci-dessous (**Figure 16**). Associés aux récepteurs aux Ig, les mastocytes expriment de manière constitutive C-kit, le récepteur du facteur de croissance Stem Cell Factor (SCF), qui assure leur différenciation, survie ou expansion et qui contrôle également leur migration⁵². Le SCF est notamment sécrété par les fibroblastes mais également par les mastocytes. En plus de son rôle de facteur de croissance, le SCF permettrait leur dégranulation et la production de cytokines en synergie avec d'autres signaux activateurs ⁵³. Les mastocytes expriment aussi certains récepteurs du complément, et les récepteurs des familles TLR et NLR qui permettent la reconnaissance des composants microbiens et ainsi la mise en place d'une réponse pro-inflammatoire après reconnaissance du pathogène infectieux. Enfin, les mastocytes expriment le récepteur de ST2, dont l'activation aboutirait notamment à la production de cytokines Th2 (**Figure 17**) ⁵⁴⁻⁵⁶. L'aptitude de l'IL-33 à induire la dégranulation des mastocytes est encore débattue ^{57,58}. L'IL-33 favorise également la maturation des mastocytes à partir de progéniteurs CD34+, leur prolifération, leur survie via BCL-XL, leur adhésion à la fibronectine et aux cellules endothéliales, et la production de chimiokines et médiateurs pro-

inflammatoires (prostaglandines et leukotrienes)⁵⁹. L'IL-33 permet d'augmenter les signaux induits par le récepteur à l'IgE et le récepteur couplé à la protéine G.

Parallèlement, les mastocytes expriment des récepteurs inhibiteurs FcγRIIb IgG receptor,⁶⁰

Sialic acidbinding, Ig-like lectins⁶⁰, qui via leurs motifs ITIM, activent les phosphatases, régulant ainsi les signaux activateurs induits par les récepteurs activateurs FcRεI et C-kit.

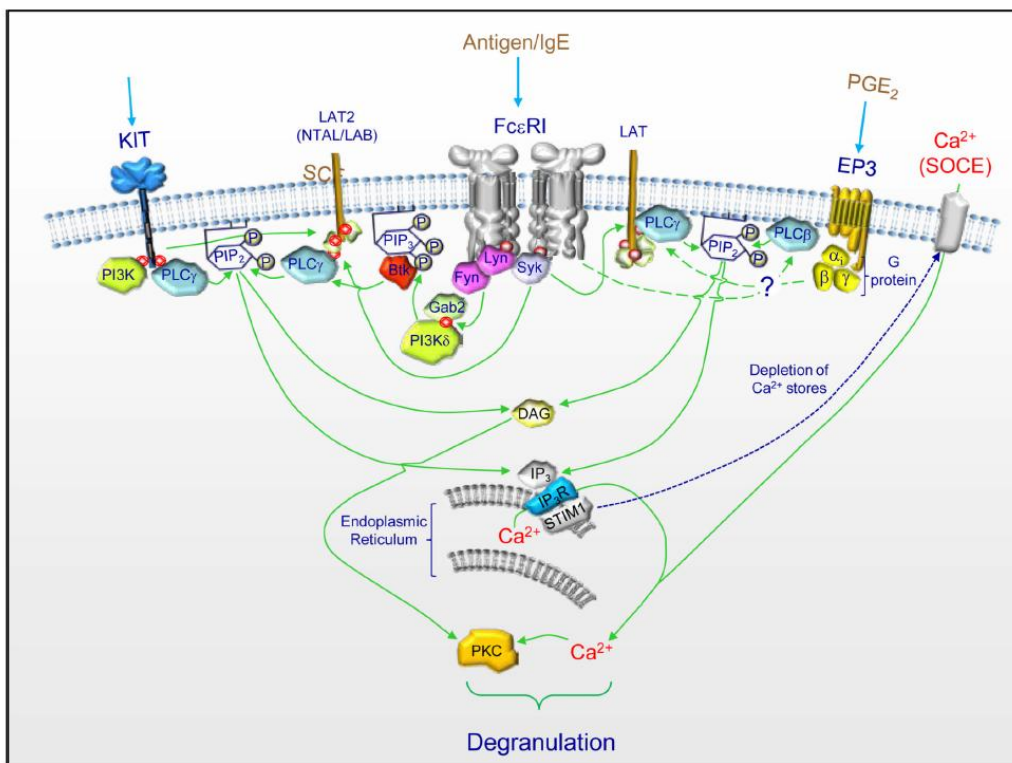


Figure n°16 : Principales voies d'activation des mastocytes⁶¹

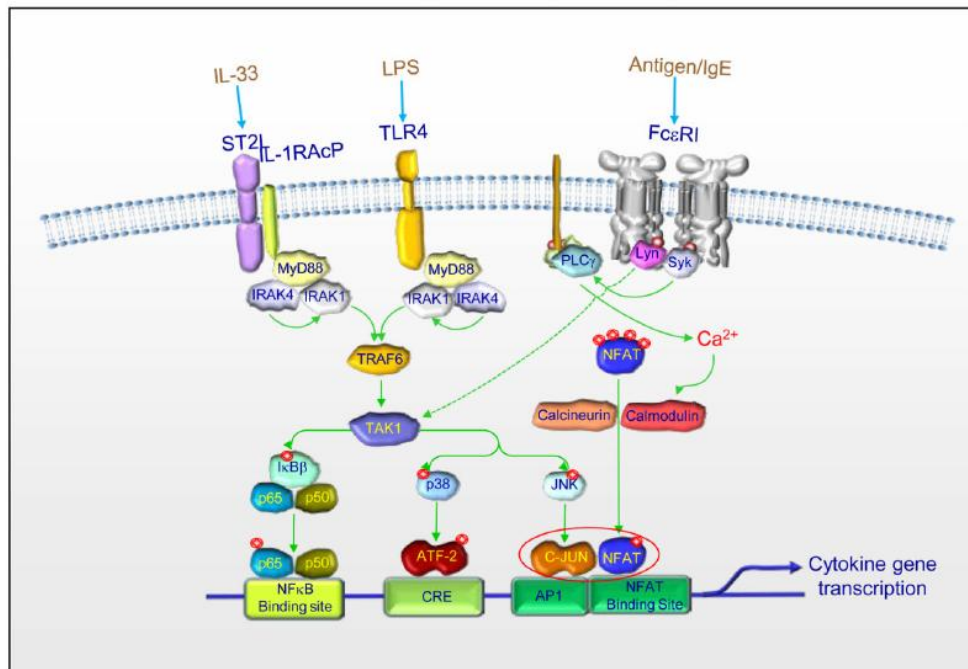


Figure n°17 : Autres voies d'activation des mastocytes , stimulation de l'IL-33 via ST2⁶¹

Principales fonctions immunologiques des mastocytes

La reconnaissance d'un large panel de pathogènes par les mastocytes leur permet de constituer une première ligne de défense efficace de l'immunité innée, et ainsi conduire à la destruction des bactéries et des parasites. Les mastocytes sont capables de détruire les pathogènes par différents moyens comme la libération de peptides anti-microbiens dans le milieu extra-cellulaire, la phagocytose et même la formation de *neutrophil extracellular traps* (NETs)⁶². Le rôle majeur des mastocytes dans la défense anti-infectieuse a été démontré dans nombre d'infections parasitaires, bactériennes et à un moindre degré virales, grâce à des modèles murins dans lesquelson observait des réponses anti-infectieuses altérées en cas de déficit en mastocytes⁶³.

Les mastocytes, du fait de leur activation par les IgE produits par les lymphocytes B, constituent également un des acteurs principaux des réactions allergiques par leur dégranulation et la libération d'histamine aboutissant à une vasodilatation, une contraction des cellules musculaires

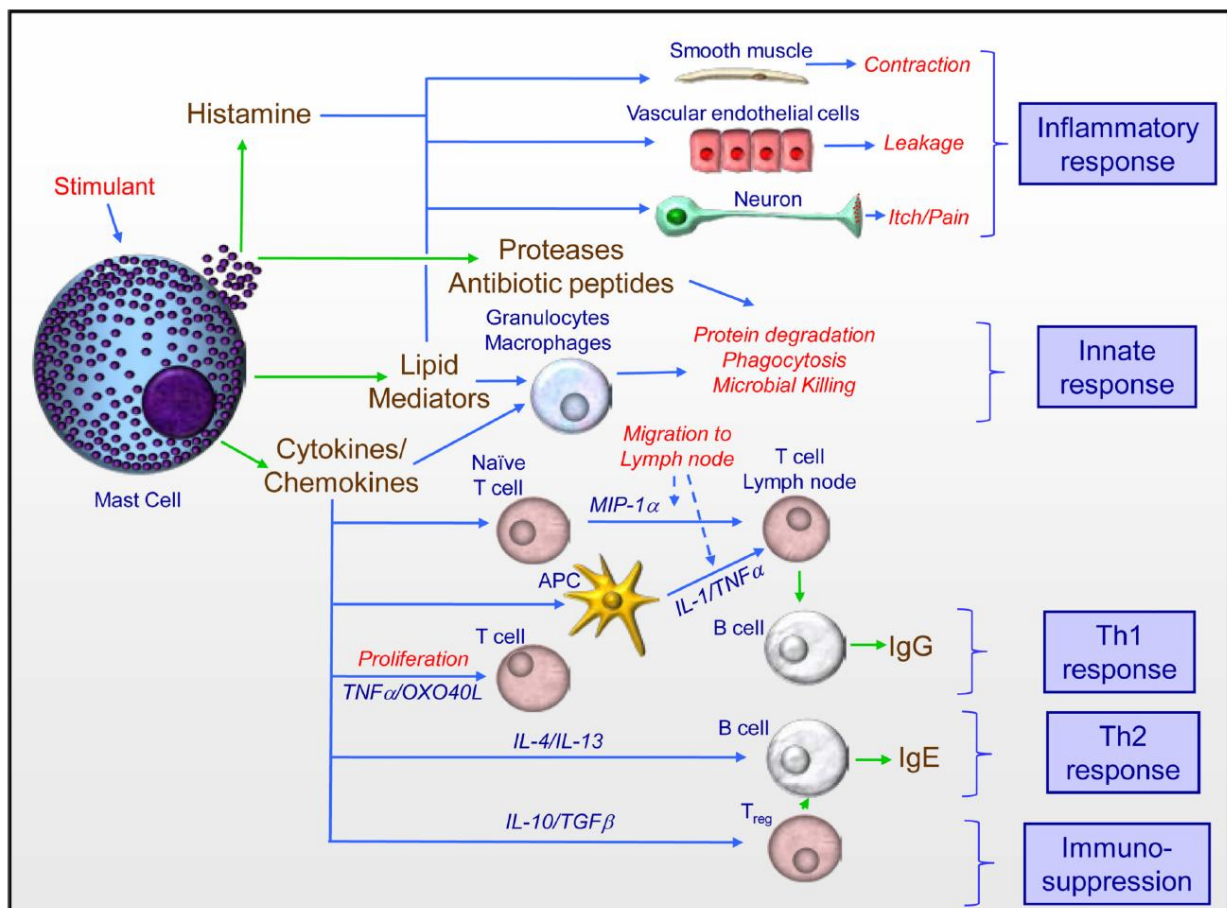
lisses et à une bronchoconstriction ⁶⁴⁻⁶⁶. Les mastocytes, via leur sécrétion de cytokines Th2 en contexte allergique, favorisent la différenciation Th2 et la production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B.

Les mastocytes sont impliqués dans certaines maladies autoimmunes. L'exemple de la polyarthrite rhumatoïde illustre parfaitement la complexité du mode d'action des mastocytes et les difficultés d'interprétation des données en fonction du modèle murin utilisé ⁶⁷. Les modèles murins permettant d'étudier l'effet de la déplétion des mastocytes sur le développement de la polyarthrite donnent des résultats contradictoires. Ces différences sont en partie explicables par les différences des modèles génétiques de déplétion en mastocytes et les différences d'induction de la polyarthrite. Dans ce sens, les souris déficientes en mastocytes (mutation de C-kit) ne développaient pas d'arthrite après injection de sérum de souris atteintes de polyarthrites, suggérant un rôle majeur des mastocytes dans la survenue d'arthrite autoimmunes. Cependant, ces souris ayant une mutation de C-kit présentaient des anomalies phénotypiques des autres lignées sanguines avec notamment une neutropénie, pouvant expliquer ces observations ⁶⁸. Dans d'autres modèles murins, dans lesquels la déplétion des mastocytes était inductible et non liée à une mutation de C-Kit, le développement des arthrites n'apparaissait qu'en l'absence de mastocytes pendant la phase d'immunisation. Dans des modèles murins d'arthrites induites par le collagène, la déplétion en mastocytes en phase pré-clinique était associée à une diminution de sévérité de la polyarthrite, alors que la déplétion en mastocytes à une phase plus tardive (après la phase d'immunisation) n'avait pas de conséquence sur la sévérité du phénotype clinique ⁶⁹. La déplétion des mastocytes n'avait pas d'effet dans les modèles murins dont la polyarthrite était induite par injection de sérums de souris arthritiques (transfert passif des effecteurs pro-inflammatoires mimant une phase tardive de la maladie mais ne reproduisant pas la phase de mise en place de la réponse autoimmune) ⁷⁰.

Chez l'homme, les données résultent d'expérimentations *in vitro*. Certaines études mettent en évidence le rôle pro-inflammatoire des mastocytes dans la polyarthrite rhumatoïde en rapportant la présence de mastocytes synoviaux et l'activation *in vitro* des mastocytes par les complexes immuns aboutissant à la sécrétion de médiateurs et cytokines pro-inflammatoires ^{71,72}. Cependant, d'autres études récentes ont mis en exergue les effets immunomodulateurs *in vitro* des mastocytes via la sécrétion d'IL-10 ⁷³. Certaines données dans un autre modèle pathologique illustre les propriétés immunorégulatrices des mastocytes. Dans un modèle murin de maladie du greffon contre l'hôte, les souris déficientes en mastocytes avaient une mortalité augmentée. Le rôle immunorégulateur des mastocytes n'était pas lié à un défaut quantitatif ou qualitatif des T régulateurs mais à des mécanismes faisant intervenir l'IL-10 ⁷⁴.

Enfin, l'implication des mastocytes dans les mécanismes d'angiogenèse et de remodelage tissulaire seront abordés dans des paragraphes dédiés. Le schéma ci-dessous (**Figure 18**) illustre les différents rôles immunologiques clés des mastocytes.

Figure n°18 : Rôles des mastocytes dans la réponse anti-infectieuse, allergique et immunomodulatrice⁶¹



4-Rôle de l'activation endothéliale et de l'angiogenèse dans la réponse inflammatoire :

Généralités sur l'activation endothéliale pendant le processus inflammatoire

Il est important de souligner que d'autres cellules que les cellules immunitaires proprement dites jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réponse immune et dans la chronicité de la réponse inflammatoire. Comme évoqué précédemment, la mise en place d'une réponse immunitaire dans un tissu engendre la sécrétion de cytokines (notamment IL-1, IL-6 et $\text{TNF}\alpha$) et de chimiokines qui ont un rôle majeur dans le recrutement des cellules inflammatoires au niveau du site pathologique, via l'activation endothéliale. Certaines cytokines pro-inflammatoires, comme le $\text{TNF}\alpha$, induisent une activation endothéliale aboutissant à :

- l'expression de chimiokines à leur surface
- l'expression par les cellules endothéliales d'intégrines comme ICAM-1 (CD-54) et VCAM-1 qui se lient à leurs récepteurs situés à la surface des leucocytes, ces derniers migrant vers le site inflammatoire.

La liaison des leucocytes à l'endothélium entraîne leur « *rolling* » à la surface endothéliale, puis leur adhésion et enfin leur migration au travers de l'endothélium (« diapédèse »), aboutissant *in fine* à leur recrutement au niveau du site inflammatoire (**Figure 19**). La diapédèse des leucocytes se fait grâce à l'augmentation de la perméabilité vasculaire, liée notamment à la diminution d'expression des molécules d'adhésion assurant la cohésion des cellules endothéliales (comme VE-cadherine).

L'activation endothéliale et l'augmentation de la perméabilité vasculaire permettant le recrutement des cellules immunes sont dépendantes d'un certain nombre de facteurs :

-les substances vaso-actives comme l'histamine, les leucotriènes (sécrités par les mastocytes activés lors de leur dégranulation), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le NO (oxyde nitrique) et les prostacyclines

-les anaphylatoxines (C5a, C4a, C3a) produites lors de la phase aigüe inflammatoire, aboutissant à une augmentation d'expression des intégrines (P-Selectine) à la surface endothéliale, à une perméabilité vasculaire accrue et à la dégranulation des mastocytes

-les cytokines pro-inflammatoires (TNF α notamment, IL-1..).

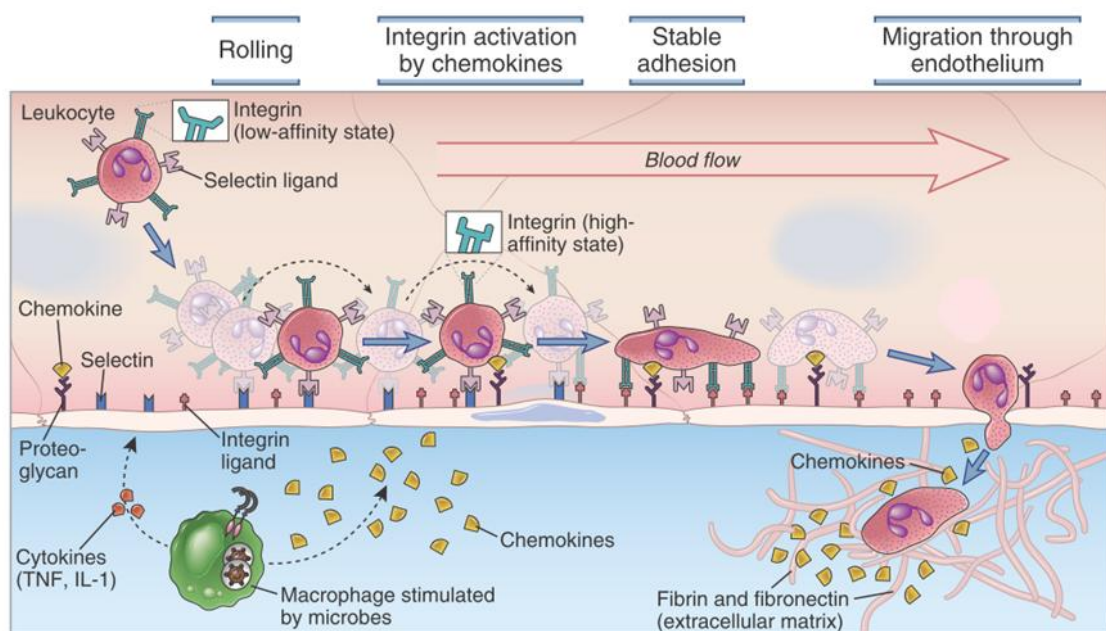


Figure 19 : Interactions entre cellules endothéliales et leucocytes aboutissant au recrutement des cellules inflammatoires

Régulation de l'angiogenèse

Les liens entre angiogenèse, inflammation et réparation tissulaire sont complexes. Toute réponse inflammatoire chronique, notamment dans les vascularites, s'accompagne d'une néo-angiogenèse importante, favorisant la persistance de la réponse inflammatoire. Cependant, les phénomènes de néo-angiogenèse sont associés à la mise en place de mécanismes de réparation tissulaire, pouvant mener à l'extrême à des lésions de fibrose. Les facteurs pro-angiogéniques majeurs, impliqués dans la néo-angiogenèse incluent le VEGF, le PDGF, l'IL-33 et certaines cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 β ⁷⁵.

Lors de l'angiogenèse induite par l'inflammation, certaines chimiokines jouent un rôle majeur. Les chimiokines sont sécrétées par les cellules endothéliales elles-mêmes, les cellules musculaires lisses et les cellules inflammatoires. CCL-2 en particulier, CCL-1, -11 et -15 favorisent la formation de tubes endothéliaux ^{76,77}. Ces chimiokines induisent les voies de signalisation pI3K, MAPK et ERK1/2, aboutissant à la production de NO et à la prolifération et migration endothéliales. Par ailleurs, elles favorisent le recrutement de macrophages sur le site inflammatoire qui, par leur activation, vont induire la sécrétion de VEGF via l'activation de la voie de NF κ B ⁷⁸ (**Figure 20**).

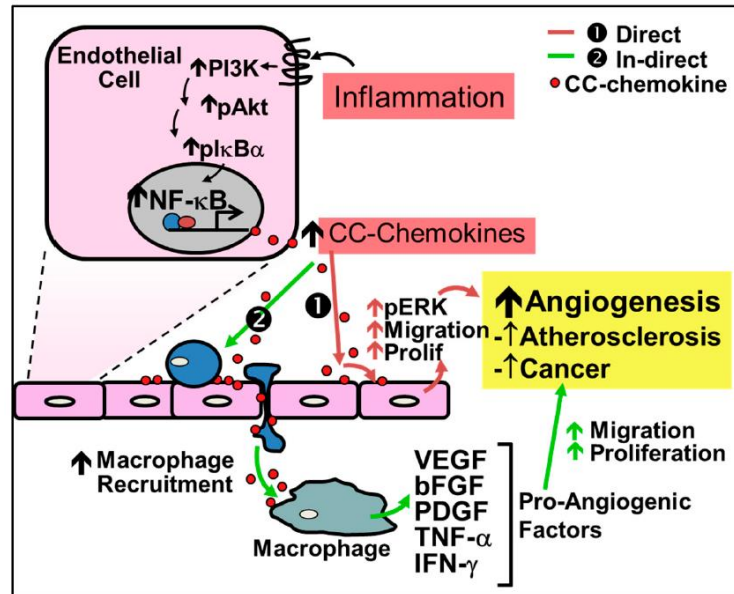


Figure n°20 : Rôle pro-angiogénique des chémokines en contexte inflammatoire

Beaucoup de données établissant le lien entre inflammation et néo-angiogenèse sont basées sur des expérimentations dans des modèles murins d'ischémie. Dans ces modèles, certaines cellules inflammatoires sont essentielles à la mise en place d'une angiogenèse efficace. Le recrutement de monocytes est crucial pour promouvoir la formation de néo-vaisseaux⁷⁹. De même, MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) s'est montré nécessaire à la mise en place de collatérales et la formation de capillaires dans un modèle d'ischémie⁸⁰. Les macrophages M2, induits par l'IL-4 et l'IL-13, sont particulièrement associés à la mise en place de mécanismes de réparation tissulaire et de néo-angiogenèse via la sécrétion de TGF-β et de VEGF. D'autres études ont montré qu'un déficit en lymphocytes T CD4⁺ et en cellules NK s'accompagnait d'une diminution de développement de collatérales et de l'angiogenèse post-ischémiques^{81,82}. Les CD8⁺ semblent favoriser la néo-angiogenèse via la sécrétion d'IL-16 permettant le recrutement de CD4⁺⁸³. Les mastocytes favorisent également l'angiogenèse en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, l'histamine, le FGF2, le TGF-β, l'héparine et l'angiopoïétine. Dans un modèle

murin d'arthrite, l'inhibition des mastocytes prévenait le développement de la néo-angiogenèse⁸⁴.

Le rôle des lymphocytes T régulateurs semble plus complexe et varie en fonction de la pathologie. Dans un modèle murin d'ischémie, les lymphocytes T régulateurs inhibaient la formation de néovaisseaux via la diminution de lymphocytes T⁸⁵. Dans le même sens, l'IL-10 était associée à des effets anti-angiogéniques, en partie par l'inhibition de production de VEGF⁸⁶.

Au cours de l'angiogenèse associée aux tumeurs, les mécanismes sont sensiblement différents. Les T régulateurs semblent être au contraire pro-angiogéniques via la sécrétion de VEGF-A⁸⁷. De même, les lymphocytes Th2, via la production d'IL-4 favorisant la différenciation des macrophages en M2, sont alors pro-angiogéniques. Inversement, les lymphocytes Th1 seraient anti-angiogéniques en favorisant la polarisation des macrophages en M1 qui inhibent l'angiogenèse via la sécrétion de CXCL9 et CXCL10 (**Figure 21**).⁸⁸

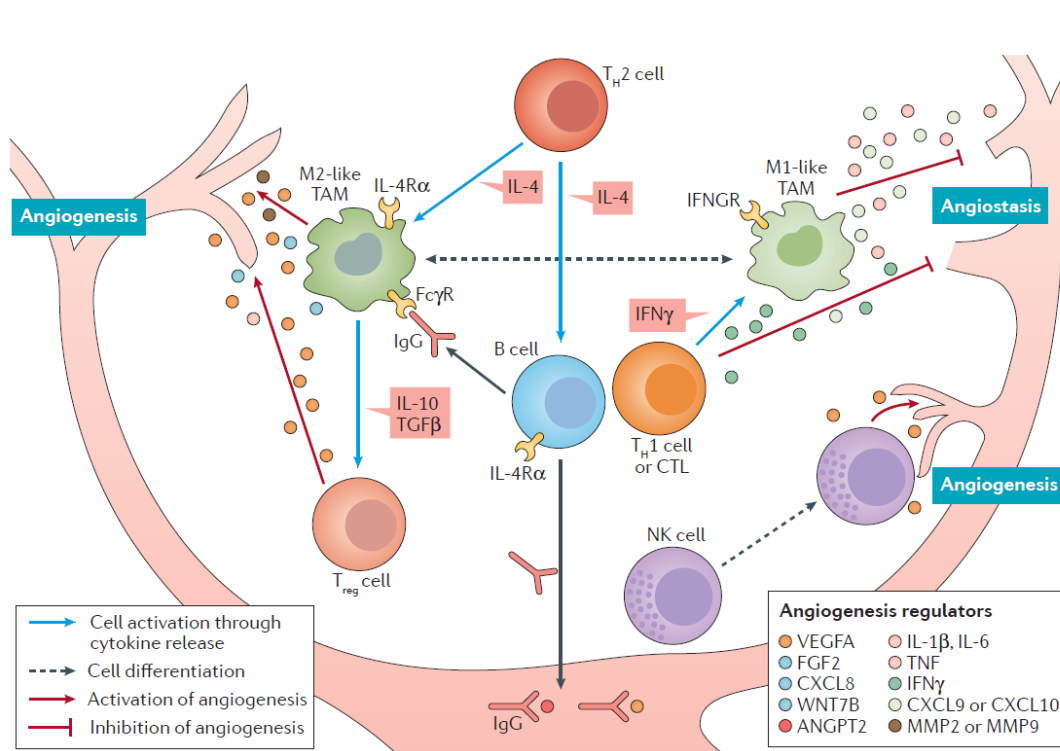


Figure n°21 : Facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques en contexte tumoral⁸⁹

5-Inflammation et remodelage tissulaire

Inflammation et réparation tissulaire

Toute inflammation s'accompagne de dommages tissulaires et par conséquent de mécanismes de réparation tissulaire. Les macrophages s'avèrent être un élément clé de régulation des mécanismes de réparation tissulaire, qui peuvent conduire au développement de fibrose tissulaire lorsqu'ils sont non contrôlés. Les macrophages se répartissent en différentes sous-populations présentant des profils transcriptionnels et phénotypes distincts, qui sont indispensables à la bonne régulation du remodelage tissulaire ⁹⁰.

- Lors de la phase inflammatoire, les macrophages ont un profil pro-inflammatoire, associé à la sécrétion d'IL-1 β , de TNF α et d'IL-6. Ils induisent alors le recrutement d'autres cellules inflammatoires, la sécrétion de métalloprotéases responsables des dommages tissulaires et de l'activation et migration des fibroblastes.
- Sous l'influence de l'IL-4 et l'IL-13, ils peuvent acquérir un phénotype dit M2, associé à un profil de réparation tissulaire. Ils induisent alors la prolifération des fibroblastes et des cellules stromales ainsi que la production de protéines de la matrice extracellulaire (protéoglycanes) via la sécrétion de *fibroblast growth factor* (FGF), TGF β et PDGF.
- Enfin, une réparation tissulaire efficace repose sur la maturation de ces macrophages en « *resolving macrophage* », qui contrôlent le processus inflammatoire via la synthèse d'IL-10, de TGF- β et d'autres immunomodulateurs. Le rôle déterminant de l'IL-10 dans le contrôle de la fibrose a également été montré dans des modèles de cardiopathie de surcharge, où l'IL-10 prévenait la migration des fibroblastes au niveau cardiaque, leur différenciation en myofibroblastes et diminuait ainsi les lésions

fibrotiques intracardiaques⁹¹. Un déficit de macrophages ayant un profil anti-inflammatoire conduit à la persistance de l'inflammation et à l'apparition de lésions fibrotiques, phénomènes observés dans les vascularites inflammatoires et d'autres maladies autoimmunes^{90,92,93}. Les schémas ci-dessous (**Figures 22 et 23**) résument les différents profils de maturation des macrophages intervenant dans la réparation tissulaire.

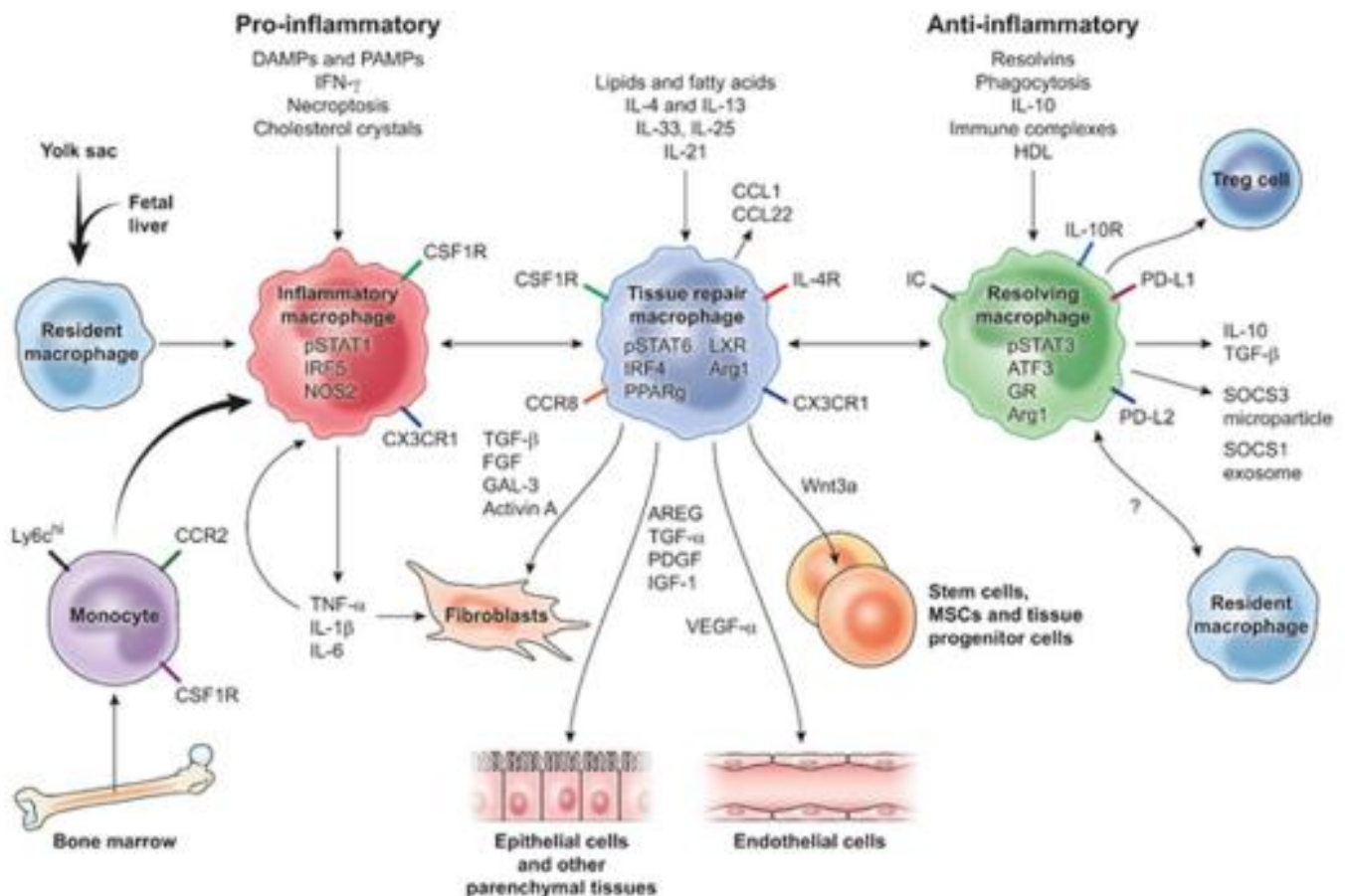


Figure n°22: Différents profils phénotypiques des macrophages contrôlant la réparation tissulaire⁹⁰

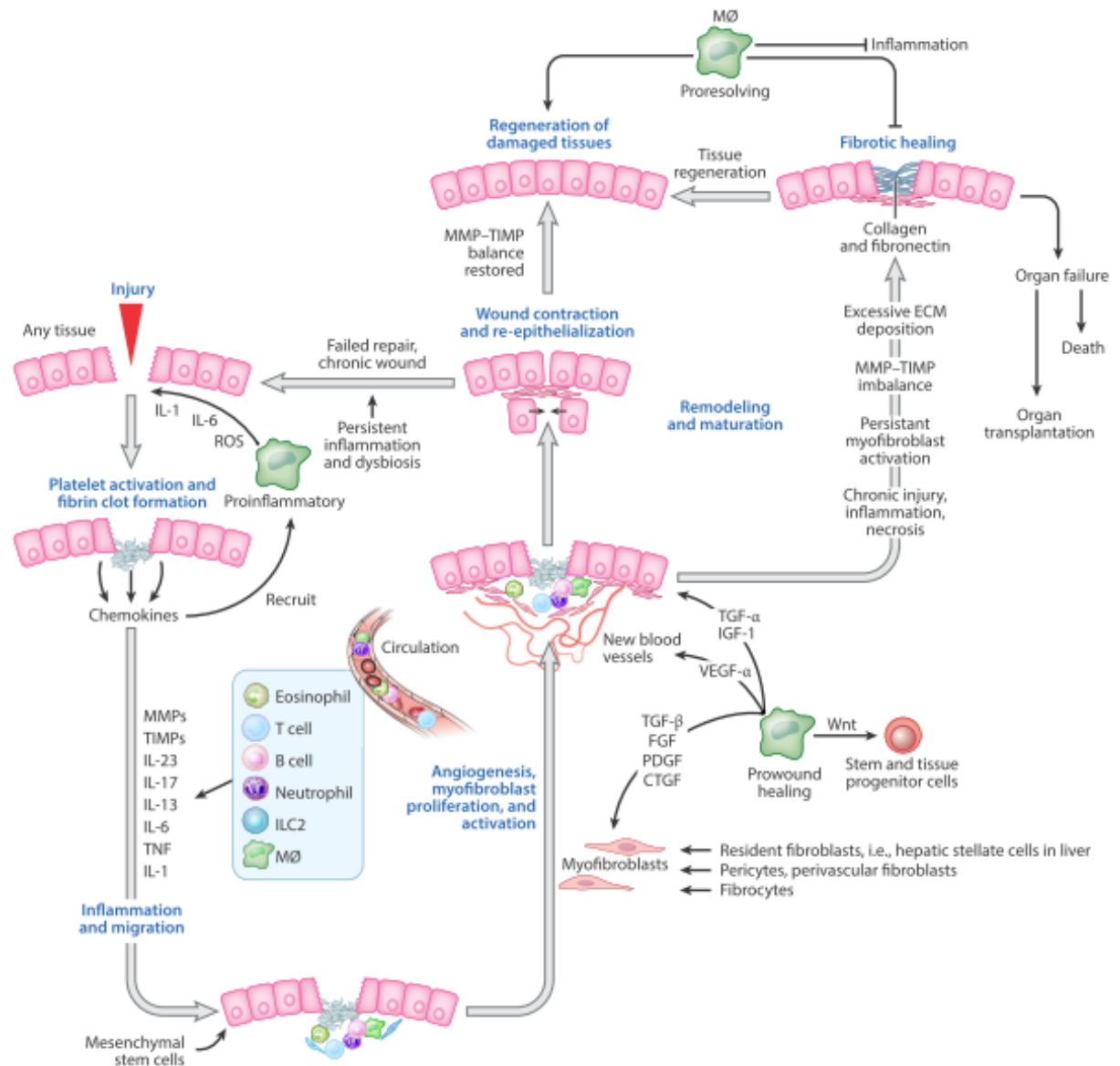


Figure n°23 : Différentes phases de la réponse inflammatoire et de réparation tissulaire lors d'une lésion tissulaire ⁹²

Si les macrophages jouent un rôle majeur dans l'orchestration des mécanismes de réparation tissulaire et de fibrose, la différenciation lymphocytaire est également centrale dans la régulation du remodelage tissulaire. Les différentes études ont montré que les lymphocytes Th2 promouvaient les mécanismes

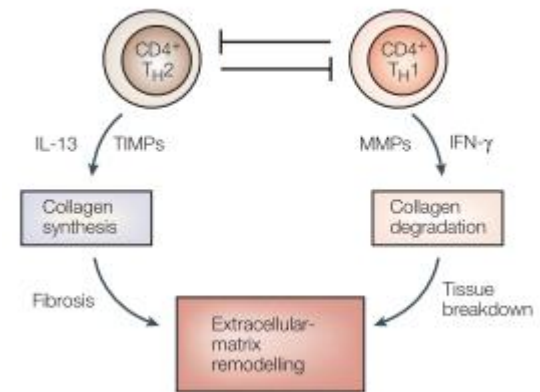


Figure n°24 : Impact des réponses Th1 et Th2 sur la fibrose

de réparation tissulaire. L'analyse du profil transcriptionnel des lymphocytes Th2 montre en effet une surexpression des gènes de réparation tissulaire. De même, via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13, ils sont connus pour induire la synthèse de collagène par les fibroblastes alors que l'IFN γ , produit par les lymphocytes Th1, l'inhiberait (**Figure 24**)^{94,95}. L'impact des lymphocytes Th17 est moins clair. Dans certaines études, l'IL-17A induisait des lésions fibrotiques pulmonaires proches de celles de la sclérodémie, de même que la synthèse de CTGF (*connective tissue growth factor*) et de collagène par les fibroblastes. D'autres études ne retrouvaient cependant pas d'augmentation de synthèse de collagène induite par l'IL-17⁹⁶. L'IL-17 conduirait en revanche à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou l'IL-8 et de métalloprotéases par les fibroblastes^{97,98}. Enfin, le rôle de l'IL-33, des lymphocytes T régulateurs et des ILC2 a également été mis en lumière. Il a récemment été démontré que les lymphocytes T régulateurs exprimant ST2 étaient nécessaires à la réparation musculaire^{99,100}. D'autres études ont montré l'importance de l'IL-33 et des ILC2 pour maintenir l'intégrité épithéliale et mettre en place les phénomènes de réparation tissulaire après infection virale via *amphiregulin gene* (AREG)^{101,102}. Si l'IL-33 intervient dans les mécanismes de remodelage tissulaire, son implication dans le développement des lésions de fibrose est encore débattue. Via son rôle pro-Th2, l'IL-33 pourrait également avoir un rôle pro-fibrotique en cas d'inflammation persistante notamment au niveau pulmonaire^{103,104}. D'autres études ont au contraire montré que l'IL-33 prévenait l'apparition de

fibrose, notamment au niveau cardiaque^{105,106}. Au niveau artériel, un modèle d'obésité chez le rat a montré une association entre l'expression aortique de ST2 soluble et le développement de lésions de fibrose vasculaire. Les cellules musculaires lisses cultivées en présence de ST2s étaient associées à une production accrue de collagène et de fibronectine, suggérant plutôt un rôle protecteur de l'IL-33 au niveau vasculaire¹⁰⁷. Du fait de ces résultats contradictoires en fonction des pathologies et du tissu concerné, les effets exacts de l'IL-33 dans les mécanismes de réparation tissulaire et dans le développement de fibrose méritent d'être étudiés plus précisément.

Inflammation et anévrisme artériel

Au niveau artériel, les anomalies du remodelage vasculaire peuvent conduire à l'apparition d'anévrismes artériels, qui constituent une des complications potentiellement sévères des vascularites des gros vaisseaux. Les anévrismes artériels résultent d'un amincissement de la paroi artérielle, pouvant conduire à la rupture du vaisseau associée à une mortalité élevée. La média, composée de cellules musculaires lisses disposées longitudinalement le long des fibres élastiques internes, assume en grande partie les propriétés mécaniques et élastiques du vaisseau. Histologiquement, les anévrismes, notamment aortiques, sont liés à des lésions dégénératives de la média, associant une raréfaction des cellules musculaires lisses, une désorganisation et une fragmentation des fibres élastiques ainsi que des dépôts excessifs de collagène et de protéoglycanes¹⁰⁸. Ces anomalies fragilisent la paroi de l'artère, aboutissant à sa dissection voire à sa rupture. Les causes sont alors diverses et varient en fonction de la localisation de l'anévrisme. Les anévrismes aortiques abdominaux sont volontiers liés à un âge avancé, un tabagisme ou une hypertension artérielle, et sont fréquemment associés à des lésions d'athérosclérose plus ou moins inflammatoires. On distingue les anévrismes aortiques

athéromateux associés à une inflammation excessive ou non ¹⁰⁹. Les anévrismes thoraciques, peuvent être liés à des maladies génétiques du tissu conjonctif comme la maladie de Marfan, le syndrome de Loeys–Dietz ou Shprintzen–Goldberg, pour lesquels une hyperactivation du TGF- β a récemment été mise en évidence. Les mécanismes par lesquels une hyperactivation de TGF- β conduit à la formation d'un anévrisme sont encore mal connus. Un remodelage tissulaire inadapté, menant à une synthèse excessive d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, et des anomalies phénotypiques des cellules musculaires lisses sont vraisemblablement associés à la fragilisation de la paroi artérielle ^{110,111}.

Les vascularites, du fait de l'inflammation chronique, sont également associées à l'apparition d'anévrismes artériels, par destruction des cellules musculaires lisses et apparition de lésions fibrosantes. Cependant, les mécanismes physiopathologiques faisant le lien entre l'inflammation chronique et la survenue d'anévrismes artériels ne sont pas bien connus à l'heure actuelle. Quelques éléments de réponses nous parviennent des modèles murins d'anévrismes induits par l'angiotensine, ou des modèles de dissections artérielles, qui sont associés à un processus inflammatoire en partie responsable de l'aggravation des lésions mécaniques artérielles ¹¹². Certaines études ont montré qu'une infiltration de macrophages CD68+, de lymphocytes CD3+ et de plasmocytes dans la média et près des vasa vasorum de l'adventice serait associée à une apoptose des cellules musculaires lisses ¹¹². Les études concernant le type de polarisation lymphocytaire associé aux lésions anévrysmales rapportent des résultats contradictoires. Certaines études ont décrit une réponse Th2 prédominante sur l'analyse histologique d'anévrismes abdominaux humains ¹¹³, alors que d'autres ont au contraire retrouvé une expression prédominante de cytokines Th1 et une surexpression de T-BET par rapport à GATA-3 ¹¹⁴. Dans un modèle murin de greffe aortique, l'inhibition d'IFN- γ était associée au développement d'un anévrisme, alors que l'administration d'un anti-IL-4 prévenait la survenue d'anévrisme. Le déficit en IFN γ était associé à une augmentation de métalloprotéases (MMP2,

3, 12, 13, 15, 19). L'augmentation d'IL-4 associée à la diminution d'IFN γ augmentait la sécrétion de MMP12 par les macrophages. Dans ce modèle d'allogreffe vasculaire, les données suggèrent qu'un déséquilibre IL-4/IFN γ en faveur de l'IL-4 favoriserait la survenue d'anévrysme aortique via la sécrétion de métalloprotéases par les macrophages¹¹⁵. D'autres données plus récentes confirment le lien étroit entre inflammation et remodelage vasculaire. Dans un modèle murin d'anévrysme artériel induit par l'angiotensine II, la déplétion en lymphocytes T régulateurs et en IL-10 était associée à une augmentation de survenue et de sévérité de l'anévrysme¹¹⁶. Le TGF- β , en régulant la réponse immune, était associé à une sévérité moindre de l'anévrysme via la diminution de MMP12¹¹⁷. Toutes ces données mettent en lumière le lien très étroit entre réponse immune déséquilibrée, remodelage vasculaire inadapté et lésions dégénératives de la paroi vasculaire pouvant mener à l'apparition d'anévrysmes artériels. Cependant, les mécanismes physiopathologiques précis reliant ces différentes phases sont encore mal connus et méritent d'être évalués plus précisément.

6-Les vascularites des gros vaisseaux :

Les vascularites (maladies inflammatoires vasculaires) sont communément classées selon la taille des vaisseaux concernés. Ainsi, on distingue les vascularites des gros, moyens et petits vaisseaux. Le schéma ci-dessous (**figure 25**) résume les différentes vascularites regroupées en fonction de leurs localisations ¹¹⁸.

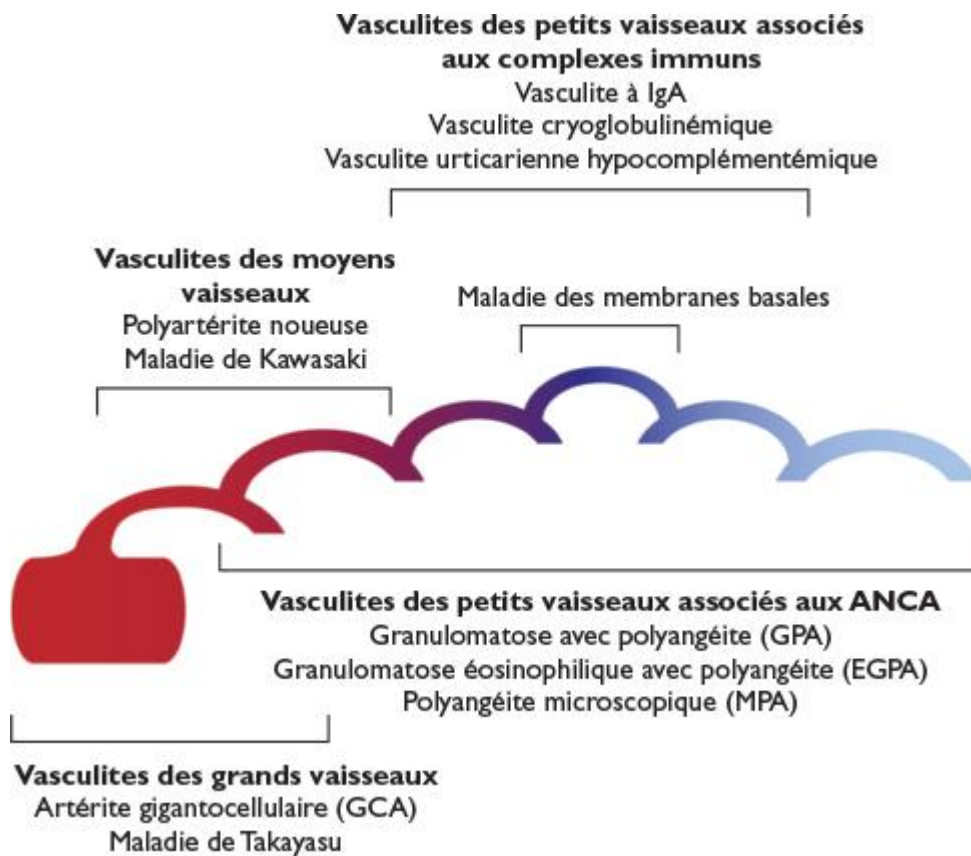


Figure n°25 : Différents types de vascularites classées en fonction du calibre des vaisseaux atteints¹¹⁸

Les vascularites des gros vaisseaux incluent principalement la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes qui sont les deux maladies sur lesquelles porteront nos travaux.

6a- L'artérite à cellules géantes :

L'artérite à cellules géantes représente une des grandes causes des vascularites des gros vaisseaux, d'autant qu'il s'agit d'une pathologie plus fréquente que la maladie de Takayasu. En France, l'incidence annuelle de l'artérite à cellules géantes varie entre 10 et 30 personnes pour 100 000 dans une population de plus de 50 ans. Sa fréquence augmente avec l'âge et est plus élevée dans les pays nordiques avec un gradient Nord-Sud¹¹⁹. La moyenne d'âge au diagnostic est de 71 ans et les femmes sont 2 fois plus touchées que les hommes¹²⁰.

Outre les signes généraux, les manifestations cliniques sont principalement liées à l'inflammation des branches artérielles de la carotide externe (artères temporales, du cuir chevelu, des artères à destination oculaire...), qui sont touchées de manière prédominante dans cette maladie. L'atteinte des artères vertébrales est plus rare mais potentiellement grave, à l'origine d'accidents vasculaires cérébraux. L'Aorte est moins fréquemment touchée que dans la maladie de Takayasu, mais son atteinte peut être à l'origine d'anévrisme aortique ou de dissections. La présentation clinique « classique » de l'artérite à cellules géantes comprend une altération de l'état général (asthénie, perte de poids) et un syndrome inflammatoire se traduisant plus ou moins par une fièvre modérée, associés à des céphalées classiquement temporales, une hyperesthésie du cuir chevelu et des arthralgies inflammatoires. Le diagnostic de certitude repose sur la constatation de lésions inflammatoires compatibles sur la biopsie de l'artère temporale.

Si on se réfère aux études épidémiologiques incluant tous les patients ayant une artérite à cellules géantes, l'espérance de vie des patients n'est pas diminuée par rapport à la population générale. Cependant, les études incluant des patients ayant une artérite à cellules géantes recrutés à partir d'un service hospitalier retrouvent une surmortalité par rapport à la population générale¹²¹. Certaines atteintes sont associées à une morbidité importante. La gravité de la maladie est en partie liée aux complications oculaires, qui sont associées à un risque important de cécité. Tout symptôme visuel constitue donc une urgence thérapeutique entraînant la mise en place

immédiate d'une corticothérapie. Les lésions oculaires sont liées le plus souvent à une neuropathie optique ischémique antérieure aigue d'origine artéritique (80%) ou une occlusion de l'artère centrale de la rétine ou d'une artère chorioïdienne¹²². Les complications aortiques (anévrismes et dissections) et les accidents vasculaires cérébraux, bien que rares, sont également responsables d'une morbi-mortalité significative. Les patients atteints d'une artérite à cellules géantes, ont un risque accru de développer un anévrisme de l'aorte¹²³. Certaines études ont montré un risque 17 fois supérieur à celui de la population générale de développer un anévrisme de l'aorte thoracique et 2 fois supérieur pour l'aorte abdominale¹²⁴. Ces anévrismes peuvent survenir plusieurs années après le diagnostic initial et nécessitent donc une surveillance spécifique. Dans une étude récente portant sur 6999 patients ayant une artérite à cellules géantes, les facteurs associés à la survenue d'un anévrisme aortique en analyse multivariée étaient : le sexe masculin, un tabagisme sévère ou non et un traitement anti-hypertenseur. Le diabète semblait au contraire être un facteur protecteur¹²³.

6b- La Maladie de Takayasu :

La maladie de Takayasu fut pour la première fois décrite par un ophtalmologiste, Mikito Takayasu, en 1908 chez une jeune femme d'une vingtaine d'années ayant une atteinte rétinienne. La maladie de Takayasu est une artérite inflammatoire chronique, qui intéresse de façon segmentaire l'aorte, ainsi que ses branches principales (coronaires, carotides, sous-clavières, vertébrales, rénales, iliaques) et les artères pulmonaires. Histologiquement, cette maladie est caractérisée par une infiltration granulomateuse de l'adventice et de la média associée à une fibrose adventitielle pouvant être majeure.

Il s'agit d'une maladie ubiquitaire bien qu'elle s'observe plus fréquemment en Asie, Amérique du Sud et dans les pays du pourtour méditerranéen. La prévalence de la maladie est de 40 à 340

cas/million d'habitants par an au Japon et de 4 à 13 cas par million d'habitants dans les pays occidentaux¹²⁵. La maladie de Takayasu atteint la femme jeune dans 80 à 90% des cas, avec un ratio femme/homme plus faible dans les pays occidentaux. La troisième décennie de vie est la période pendant laquelle l'incidence de survenue est la plus forte.

Il est classique de distinguer la période aiguë, dite pré-occlusive, et la phase occlusive, caractérisée par des manifestations ischémiques. Ces deux phases peuvent être séparées par une période asymptomatique ou être au contraire intriquées. La phase pré-occlusive associe des signes généraux avec une fièvre, des arthralgies, signes cutanés, et douleurs sur les trajets artériels (notamment des carotidodynies). La phase occlusive est la conséquence des lésions artérielles (sténoses, oblitérations, anévrysmes). Les localisations les plus fréquentes de la maladie sont : l'aorte (thoracique 40%, abdominale 30%), les artères sous-clavières (90%), les carotides primitives (50%), les artères vertébrales (30%), rénales (20-40%), le tronc coeliaque, les artères mésentériques (5-15%), iliaques (15-25%), coronaires (5-10%) et pulmonaires (5%)¹²⁶⁻¹²⁹. Les symptômes sont liés aux sténoses et occlusions artérielles et dépendent de l'importance de la circulation collatérale. On observe fréquemment une claudication d'un membre à l'effort, plus fréquente aux membres supérieurs qu'aux membres inférieurs, un syndrome de Raynaud, l'abolition d'un pouls, la présence d'un souffle vasculaire ou une asymétrie tensionnelle. L'hypertension artérielle (par sténose des artères rénales) est fréquente, 30-70% selon les séries. Les complications neurologiques et cardiaques font toute la gravité de la maladie. Les signes neurologiques sont liés à une atteinte des troncs supra-aortiques. Les symptômes peuvent être des céphalées, une carotidodynie, des malaises voire des pertes de connaissance, ou plus rarement des accidents vasculaires ischémiques transitoires ou constitués. Les atteintes oculaires sont représentées le plus souvent par une rétinopathie ischémique (rétinopathie proliférante, hémorragies du vitré...). Les atteintes cardiaques peuvent être liées à une atteinte coronarienne (7-10%) et même de la microcirculation coronarienne. On retrouve

également des valvulopathies, le plus souvent liées à une insuffisance aortique par dilatation de l'anneau.

Le traitement repose essentiellement sur l'emploi de traitement anti-inflammatoires stéroïdiens (corticothérapie par voie générale essentiellement) et immunosuppresseurs (comme le méthotrexate). Certaines biothérapies spécifiques comme les inhibiteurs du TNF α et de l'IL-6 se sont également révélées très intéressantes dans les formes réfractaires et/ou particulièrement sévères de la maladie.

6c- Les données histologiques :

L'analyse histologique artérielle d'un patient ayant une artérite à cellules géantes met classiquement en évidence une panartérite granulomateuse, comprenant volontiers des cellules géantes, prédominant dans la média (jonction médio-intimale). On observe habituellement une destruction des cellules musculaires lisses et une fragmentation de la limitante élastique interne. Dans l'artérite à cellules géantes avec atteinte aortique, l'analyse histologique met en évidence une aortite granulomateuse liée à une inflammation granulomateuse de la média, comprenant des cellules épithélioïdes et des cellules géantes, habituellement associée à un infiltrat lympho-plasmocytaire dans l'adventice. La partie interne de l'aorte est plus souvent affectée que la moitié externe ou l'adventice. On retrouve fréquemment une hyperplasie de l'intima alors que l'adventice est relativement épargnée (contrairement à la maladie de Takayasu)¹⁰⁹.

La maladie de Takayasu se caractérise par des infiltrats inflammatoires diffus granulomateux de la média, de la jonction média-intimale et de l'adventice, affectant souvent les vasa vasorum. L'infiltrat inflammatoire est composé de macrophages, lymphocytes B et T, plasmocytes et éosinophiles. A une phase plus tardive, les processus de cicatrisation mènent au développement d'une fibrose adventitielle dense et un épaissement fibreux de l'intima. L'épaisseur de la paroi

aortique est généralement plus importante dans la maladie de Takayasu que dans l'artérite à cellules géantes¹⁰⁹.

6d- Physiopathologie des vascularites des gros vaisseaux :

Les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Takayasu sont loin d'être parfaitement élucidés. Les lésions sont liées à la présence d'un infiltrat inflammatoire majoritairement constitué de lymphocytes T gamma delta, NK, T CD8+ cytotoxiques ayant une forte expression de perforine, T CD4+ et de macrophages¹³⁰. Un déséquilibre de l'homéostasie lymphocytaire en faveur d'une réponse excessive Th1 et Th17 a été récemment mis en évidence¹³¹.

Plusieurs études plaident en faveur de l'hypothèse d'une stimulation antigénique artérielle responsable de l'initiation de la réponse inflammatoire. La présence de cellules dendritiques (CD86+) en co-localisation avec les lymphocytes T CD4+, et l'association de certains CMH de classe II avec la survenue d'une maladie de Takayasu (HLA-B52 et HLA-DR4) pourraient en effet conforter cette hypothèse¹³². Un grand nombre d'études a analysé l'association entre maladie de Takayasu et la tuberculose. La prévalence de la maladie de Takayasu est accrue dans certaines régions géographiques à forte prévalence de *Mycobacterium tuberculosis* et certaines études ont décrit des cas d'association de tuberculose et de maladie de Takayasu. L'expression de HSP65 de *Mycobacterium tuberculosis* dans les artères de maladie de Takayasu serait également un élément en faveur¹³³. Cependant, ces données n'ont pas été confirmées par des études récentes¹³⁴.

La physiopathologie de l'artérite à cellules géantes reste également insuffisamment connue. De nombreuses études ont démontré que les patients ayant une artérite à cellules géantes ont une fréquence plus élevée d'antécédents cardiovasculaires (antécédents de dyslipidémie, d'hypertension artérielle, de diabète, de maladie cardiovasculaire, cérébro-vasculaire...) ¹²³.

D'un point de vue immunologique, le rôle prépondérant des lymphocytes T a été mis en évidence dans les études antérieures comme en témoigne la diminution significative de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1 et IFN γ) après déplétion des lymphocytes T chez des souris SCID ayant été préalablement greffées avec un explant d'artère temporale de patients ayant une artérite à cellules géantes¹³⁵. Le profil cytokinique au niveau des artères temporales et au niveau sérique de patients révélait une surexpression d'IL-1b, d'IL-6, d'IFN γ et d'IL-17^{135,136}.

Comme dans la maladie de Takayasu, on observe un déséquilibre de l'homéostasie lymphocytaire en faveur d'une réponse Th1/Th17^{131,137,138} et un déficit des T CD4+ régulateurs^{138,139}. Les patients ayant une artérite à cellules géantes ont des taux plus élevés de lymphocytes T CD4+ sécrétant de l'IFN γ et de l'IL-17, en comparaison aux témoins. Les taux d'IL-17 et d'IFN γ circulants dans le plasma sont plus élevés chez les patients porteurs d'une artérite à cellules géantes et le nombre de transcrits des gènes de l'IL-17, de l'IFN γ et de FOXP3 est significativement augmenté dans les artères temporales d'artérite à cellules géantes par rapport aux artères contrôles. Dans l'étude de Deng et al., le traitement par corticoïdes était associé à une diminution des IL-17, IL-1 β , IL-6 et IL-23 au niveau des artères temporales, et des IL-1 β et IL-6 dans le plasma¹³⁷. Cependant, il n'y avait pas de différence d'expression de l'IL-12 et de l'IFN γ chez les patients (traités ou non) au niveau des artères temporales. Des taux élevés d'IL-17 étaient associés à une diminution du risque de rechute¹⁴⁰. Les mécanismes régulant la différenciation lymphocytaire sont mal connus. L'équipe de Cornélia Weyand a démontré que l'inhibition des interactions entre les ligands NOTCH et leurs récepteurs diminuait la survie et l'activation des lymphocytes T ainsi que la polarisation Th17¹⁴¹. L'IL-32, une cytokine produite par les cellules endothéliales et induisant une réponse Th1, s'est révélée up-régulée dans les artères temporales au cours de l'artérite à cellules géantes¹⁴². Récemment, Ciccia et al. ont montré une expression accrue d'IL-9 par les lésions artérielles inflammatoires temporales. La surexpression d'IL-9 était associée à la présence d'une inflammation transmurale et une

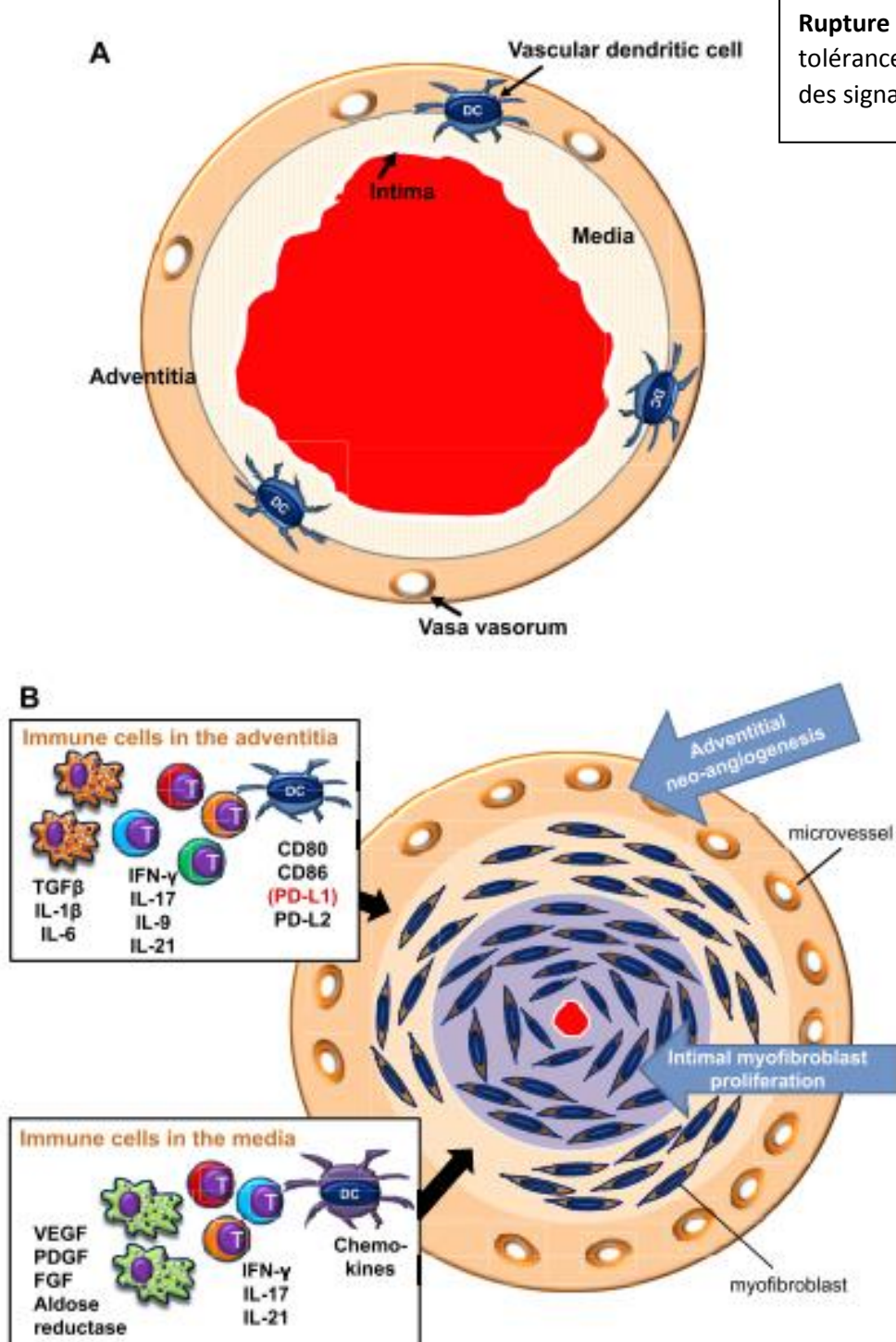
vascularite des petits vaisseaux alors que l'IL-17 était surexprimée dans les formes associées à une vascularite des vasa-vasorum ¹⁴³. D'autres équipes ont également montré le rôle prépondérant des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dans la physiopathologie de l'artérite à cellules géantes. Les taux de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques et de granzymes A et B étaient plus élevés chez les patients ayant une artérite à cellules géantes, et la forte infiltration intra-pariétale de T CD8+ était associée à la présence de complications visuelles¹⁴⁴.

Le rôle des lymphocytes B peut également être discuté dans l'artérite à cellules géantes. Une diminution significative du nombre de lymphocytes B périphériques à la phase active, résolutive lors de la rémission, a été rapportée. Cette diminution était inversement corrélée aux taux de C réactive protéine (CRP) et aux taux sériques de BAFF. Cependant, la faible infiltration de lymphocytes B au sein des artères temporales rend peu probable l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes B seraient séquestrés au niveau des sites inflammatoires artériels ¹⁴⁵.

Plusieurs arguments plaident, dans l'artérite à cellules géantes, pour une stimulation antigénique à la phase initiale de la maladie. L'association de l'artérite à cellules géantes avec certains allèles des molécules CMH de classe II (HLA-DRB1*04 en particulier) suggère un rôle important de la présentation antigénique dans la physiopathologie de la maladie. L'avantage de survie de certains clones T dans un modèle murin ¹³⁵, persistant au cours du temps et associé à une restriction d'hétérogénéité du répertoire du TCR, suggérerait également une stimulation antigénique chronique. Dans ce sens, certaines études ont étudié le rôle d'un facteur déclenchant infectieux. Certains auteurs ont détecté la présence d'antigènes du virus varicelle zona (VZV) par immunohistochimie dans 73% des biopsies d'artères temporales (BAT) positives contre 64% des patients cliniquement suspects d'artérite à cellules géantes mais ayant une BAT négative, et 22% des BAT issues de sujets témoins ¹⁴⁶. Une étude a même rapporté des réponses cliniques favorables sous acyclovir ; néanmoins le diagnostic d'artérite à cellules géantes dans cette étude était discutable¹⁴⁷. Des études ultérieures récentes n'ont pas confirmé ces données. La présence

du génome du VZV n'a en effet pas été mise en évidence par PCR dans une étude plus récente, suggérant un faux positif des études antérieures¹⁴⁸. La détection des antigènes viraux dans les artères temporales lors des études précédentes pourrait être liée à une réactivité croisée avec certains antigènes artériels¹⁴⁸.

Les cellules dendritiques semblent jouer un rôle majeur dans l'initiation de la réponse inflammatoire artérielle. Certaines études ont montré un défaut d'expression de signaux inhibiteurs comme PDL-1 par les cellules dendritiques, qui ont un profil activé dans l'artérite à cellules géantes. Ce déséquilibre entre récepteurs activateurs et inhibiteurs pourrait causer une « rupture de tolérance » des cellules dendritiques puis en conséquent une activation des lymphocytes T. Ceci pourrait conduire à la réponse inflammatoire artérielle chronique¹⁴⁹. Certaines données mettent en lumière le rôle des TLR dans la physiopathologie de l'artérite à cellules géantes. Une surexpression des TLR2 et 4 a été rapportée dans cette maladie. Deng et al. ont mis en évidence des différences de phénotype d'artérite en fonction des TLR stimulés¹⁵⁰. Dans un modèle chimérique de souris SCID ayant été greffées d'une artère temporale saine et ayant reçu des lymphocytes T CD4+ allogéniques, la stimulation des cellules dendritiques via le TLR4 (par du LPS) induisait des lésions histologiques de panartérite, via le recrutement de lymphocytes T CD4+ CCR6+ et une surexpression de son ligand CCL20. La stimulation des cellules dendritiques via le TLR5 (par la flagelline) induisait une inflammation adventitielle (vasa vasorum). Une autre étude a mis en évidence un profil distinct d'expression des TLR en fonction de la localisation de l'artère touchée¹⁵¹. Les différents acteurs intervenant dans la réponse immune de l'artérite à cellules géantes sont présentés dans la **figure 26**. Cette réaction inflammatoire chronique non contrôlée est alors responsable de processus de néo-angiogenèse et de réparation tissulaire, engendrant une prolifération myofibroblastique et *in fine* une occlusion progressive du vaisseau.



Rupture de tolérance : Défaut de tolérance au niveau des DC (défaut des signaux inhibiteurs : PDL-1/PD1)

Figure n°26 : Physiopathologie des artérites à cellules géantes¹⁴⁹

6e-Les enjeux de recherche dans les vascularites des gros vaisseaux :

Nous ne disposons pas à l'heure actuelle de marqueur diagnostique suffisamment sensible et spécifique, que ce soit pour l'artérite à cellules géantes ou la maladie de Takayasu. Le diagnostic des vascularites des gros troncs repose donc actuellement sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques, voire histologiques.

Concernant la maladie de Takayasu, le diagnostic repose sur la survenue de sténoses voire d'occlusions artérielles chez un sujet jeune sans facteur de risque cardiovasculaire, plus ou moins associée à un syndrome inflammatoire et des images évocatrices de vascularite sur les examens radiologiques (hyper-métabolisme artériel au TEP-TDM, et/ou épaissement pariétal artériel au doppler, à l'angio-IRM ou l'angio-TDM..). Les difficultés diagnostiques surviennent en l'absence de signe inflammatoire chez certains patients ayant pâti d'un retard diagnostique et ayant déjà évolué vers un stade tardif de leur maladie où les lésions fibro-cicatricielles dominent le tableau. Dans l'artérite à cellules géantes, des problèmes diagnostiques peuvent également se poser en pratique clinique. Si l'existence de lésions inflammatoires granulomateuses à cellules géantes au niveau de l'artère temporale permet de poser avec certitude le diagnostic, cet examen n'est positif que chez 30-70% des patients selon les séries. Dans les autres cas, le diagnostic repose alors sur un ensemble d'éléments cliniques et biologiques.

L'évaluation de l'évolutivité des lésions et de la réponse thérapeutique peut parfois s'avérer complexe. Si la présence d'un syndrome inflammatoire biologique [augmentation de la VS, de la CRP ou du fibrinogène] peut être un indicateur de l'activité de la maladie, il existe des aggravations patentes de lésions artérielles sans stigmate inflammatoire biologique (notamment dans la maladie de Takayasu). L'interprétation des données d'imagerie est parfois délicate. Certaines études ont tenté d'évaluer la pertinence du TEP-TDM dans le suivi de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux. Un hyper-métabolisme artériel peut signifier une

inflammation intra-pariétale alors même que les marqueurs biologiques d'activité inflammatoire « classiques » sont négatifs. A contrario, l'hyper-métabolisme persistant au niveau d'une lésion artérielle n'est pas forcément spécifique d'un processus inflammatoire persistant intra-pariétal, mais peut être lié à des remaniements fibro-cicatriciels. Une méta-analyse récente sur l'utilisation du TEP dans la maladie de Takayasu (7 études, 191 patients) a retrouvé pour le TEP-TDM une sensibilité de 87% et une spécificité de 73% en comparaison aux moyens « conventionnels » pour déterminer l'activité de la maladie¹⁵². Des études complémentaires sur le profil évolutif des différents phénotypes de patients à l'imagerie sont nécessaires pour préciser la place de tels outils dans le suivi de cette maladie.

Les outils diagnostiques et pronostiques dans les vascularites des gros vaisseaux semblent encore imparfaits. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques spécifiques impliqués dans chacune de ces maladies serait donc d'une aide précieuse pour la mise en évidence de nouveaux marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques qui aideraient la prise en charge de ces patients en pratique clinique.

B-Objectifs

Les maladies inflammatoires sont caractérisées par un défaut de la réponse régulatrice et un déséquilibre des réponses immunes lymphocytaires T aboutissant à un processus inflammatoire persistant. Les réponses lymphocytaires Th1 et Th17 sont prédominantes au cours des vascularites des gros vaisseaux. Néanmoins, nous avons mis en évidence dans ces maladies une production de cytokines Th2 par les cellules mononucléées périphériques et au sein des lésions inflammatoires aortiques, en sus des réponses Th1 et Th17 prédominantes. Les vascularites inflammatoires sont également caractérisées par une néo-angiogenèse importante qui participe à la persistance du processus inflammatoire. Tout processus inflammatoire s'accompagne de dégâts tissulaires, et donc de phénomènes de réparation plus ou moins bien contrôlés, conduisant à des lésions de fibrose voire à des anévrysmes artériels. Les « acteurs » inflammatoires impliqués dans ce type de lésions sont encore mal connus, en particulier dans les maladies inflammatoires vasculaires.

Il semble donc particulièrement intéressant au cours des vascularites inflammatoires des gros vaisseaux de déterminer plus précisément le rôle des acteurs cytokiniques et cellulaires impliqués dans la régulation de la balance lymphocytaire T, et d'explorer leur impact sur les mécanismes de réparation tissulaire et sur la « réponse vasculaire » (activation endothéliale et néo-angiogenèse participant à la pérennisation du processus inflammatoire).

Compte tenu du rôle de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immune dans les maladies autoimmunes et allergiques (via une réponse Th2), de son implication dans les mécanismes de néo-angiogenèse et de son expression dans les artères temporales de patients ayant une artérite à cellules géantes¹⁵³, nous avons voulu étudier son rôle, jusque-là méconnu, dans les vascularites des gros vaisseaux. De plus, le rôle des mastocytes, cibles majeures de l'IL-33, est très peu connu dans les vascularites, bien que des données récentes mettent en lumière leur implication

dans la régulation de la réponse immune au cours des maladies inflammatoires. Nous avons donc également décidé d'étudier l'impact du « couple IL-33/mastocytes » sur les différentes facettes des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les vascularites des gros vaisseaux, c'est-à-dire la régulation de la réponse immune, la néo-angiogenèse et les mécanismes de réparation tissulaire.

Par ailleurs, les vascularites des gros vaisseaux partagent de nombreux points communs dans leur présentation clinique. Cependant, il existe des distinctions franches comme leur âge de survenue, l'association à des molécules CMH de classe II différentes, des origines géographiques distinctes ou la localisation préférentielle des lésions artérielles, suggérant des mécanismes physiopathologiques en partie différents. L'objectif de la 2^{ème} partie de nos travaux était donc de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la réponse immune spécifiques à chacune de ces maladies, artérite à cellules géantes et maladie de Takayasu. Nous avons comparé les profils de différenciation et d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ de patients ayant une maladie de Takayasu et une artérite à cellules géantes, grâce à l'analyse des données issues du transcriptome de ces populations lymphocytaires.

C-Résultats

Présentation de l'article n°1 : IL-33, mastocytes et régulation de la réponse immune.

Justification

Les vascularites des gros vaisseaux, comprenant la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes, sont caractérisées par des lésions artérielles inflammatoires granulomateuses, (comprenant des cellules épithélioïdes et des cellules géantes pour l'artérite à cellules géantes), associées à une néo-vascularisation adventitielle importante, une désorganisation architecturale de la paroi artérielle et des lésions fibrotiques. Ces maladies sont également caractérisées par des réponses Th1 et Th17 excessives et dérégulées. Les mécanismes régulant le déséquilibre des réponses immunes Th1 et Th17 ne sont pas suffisamment connus actuellement. L'IL-33 est une alarmine sécrétée en cas de nécrose cellulaire et est connue pour avoir un rôle important dans la régulation de la réponse immune dans les maladies autoimmunes et inflammatoires

Objectif

Au cours de ce travail, nous avons évalué le rôle de l'IL-33 et des mastocytes sur la régulation de la réponse immunitaire dans les vascularites des gros vaisseaux.

Méthodes

Nous avons réalisé des expérimentations *in vitro* à partir de cellules mononucléées périphériques (PBMC) de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux, mises en culture avec ou sans stimulation d'IL-33. Nous avons pu ainsi déterminer la sécrétion des cytokines Th1, Th2 et régulatrices dans les surnageants de cultures par Milliplex® et au niveau intracellulaire par cytométrie en flux, ainsi que la proportion de lymphocytes T régulateurs. Nous avons réalisé des co-cultures de lymphocytes T CD4⁺ de patients présentant une vascularite des gros vaisseaux avec des mastocytes (lignée ROSA-WT) en présence ou non d'IL-33, afin d'étudier la proportion

de lymphocytes T régulateurs en cytométrie en flux et la sécrétion de cytokines Th1 et Th2 dans les surnageants de culture. Enfin, nous avons déterminé par PCR quantitative l'expression relative des ARNm de l'IL-33 et de cytokines Th1, Th2 et régulatrices, afin d'étudier *in vivo* les corrélations entre l'IL-33 et les réponses immunes Th1, Th2 et régulatrices.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence des niveaux accrus d'IL-33 dans le sérum et au sein des lésions inflammatoires aortiques des patients ayant une vascularite des gros vaisseaux par rapport aux témoins. Si les réponses Th1 et Th17 sont prédominantes dans ces maladies, nous avons également montré une production de cytokines Th2 par les cellules mononucléées périphériques des patients ainsi qu'une expression d'IL-4 au sein des lésions inflammatoires artérielles.

Nous avons ensuite cherché à déterminer l'impact de l'IL-33 sur la régulation de la réponse immune et notamment Th2. Nous avons démontré que l'IL-33 était associée à une augmentation de l'expression de cytokines Th2 par les PBMC de patients atteints de vascularite des gros vaisseaux. De plus, l'IL-33 contribuait directement à la réponse régulatrice puisque la présence d'IL-33 était associée à une augmentation de la proportion de lymphocytes T régulateurs.

Les mastocytes étant une cible majeure de l'IL-33, nous avons également étudié l'impact du « couple IL-33/mastocytes » sur la régulation de la réponse immune. Nous avons d'abord démontré une proportion augmentée de mastocytes dans les lésions aortiques de vascularites des gros vaisseaux par rapport aux contrôles aortiques non inflammatoires. L'IL-33, en présence de mastocytes, était associée à une augmentation encore plus importante de la proportion de lymphocytes T régulateurs [proportion médiane des lymphocytes T CD25^{hi}FOXP3⁺CD4⁺ de 1,88% en présence de lymphocytes T CD4⁺ seuls vs 11,02% en présence de lymphocytes T CD4⁺, de mastocytes et d'IL-33 (p=0,008)] et à une surproduction de cytokines Th2 (IL-5, IL-13

et IL-4) dans les milieux de co-cultures. Nous avons également démontré une augmentation de l'activité d'indoléamine 2 3-dioxygénase (IDO) dans les mastocytes stimulés par l'IL-33 et une augmentation de la sécrétion d'IL-2 dans les cultures associant lymphocytes T CD4⁺ et de mastocytes stimulés par l'IL-33. Ces données suggèrent que l'action immunomodulatrice des mastocytes et de l'IL-33 pourrait être liée à la sécrétion d'IL-2 et d'IDO. *In vivo*, l'expression relative aortique de l'ARNm de l'IL-33 était significativement corrélée à celles de l'IL-10 et du TGF- β .

Conclusion

Nos données dans les vascularites des gros troncs démontrent le rôle immunomodulateur de l'axe IL-33/ST2, en partie lié à l'action des mastocytes. L'IL-33 et les mastocytes semblent ainsi réguler les réponses Th1 et Th17, en favorisant une réponse Th2 et une réponse régulatrice via l'augmentation des lymphocytes T régulateurs.

Cet article a été soumis dans la revue *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

Présentation de l'article n°2 : IL-33 et mastocytes, impact sur l'angiogenèse et le remodelage tissulaire dans les vascularites des gros vaisseaux

Justification

Les lésions de vascularite des gros vaisseaux résultent d'une inflammation chronique associée à une néo-angiogenèse importante et à des phénomènes de remodelage tissulaire. L'IL-33 est impliquée dans l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire.

Objectif

Dans la présente étude, nous avons évalué l'impact de l'IL-33 sur l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire et l'homéostasie tissulaire dans les vascularites des gros vaisseaux.

Méthodes

Pour évaluer l'impact de l'IL-33 sur l'angiogenèse, nous avons réalisé des études *in vitro* utilisant des cellules endothéliales humaines de cordon ombilical (HUVECs) nous permettant d'évaluer la migration, la prolifération et l'angiogenèse en présence ou non d'anticorps neutralisant anti-IL-33. La perméabilité vasculaire a été évaluée *in vivo*, en utilisant le test de Miles, visant à évaluer l'extravasation vasculaire chez des souris wild type (WT) ou déficientes en mastocytes, après injection de sérums de patients ayant une vascularite plus ou moins incubés avec un inhibiteur de l'IL-33. Enfin, des fibroblastes issus d'artères humaines ont été mis en culture en présence de sérum de patients ou des surnageants de culture de mastocytes. La différenciation et la prolifération des fibroblastes ont été ensuite évaluées par cytométrie en flux et PCR quantitative.

Résultats

Nous avons montré que les sérums de patients avec une vascularite des gros vaisseaux avaient des propriétés pro-angiogéniques en favorisant la prolifération des HUVEC, la formation de tubes et de sprouts *in vitro*. Ces effets pro-angiogéniques étaient en partie dépendants de l'IL-33 dans la mesure où l'addition d'un anticorps neutralisant l'IL-33 inhibait la néo-angiogenèse et la migration des cellules endothéliales *in vitro*.

In vivo, l'injection de sérums de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux était associée à une augmentation de l'extravasation vasculaire, effet partiellement inhibé en présence d'inhibiteur de l'IL-33. De plus, les sérums de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux entraînaient une augmentation d'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales. La présence d'IL-33 recombinante conduisait à une augmentation d'expression d'ICAM-1 alors que l'inhibition d'IL-33 diminuait son expression, montrant ainsi que l'activation endothéliale induite par les sérums de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux était en partie liée à l'IL-33.

Comme les mastocytes représentent une des principales cibles de l'IL-33, nous avons répété ces expériences chez des souris déficientes en mastocytes. L'extravasation vasculaire était significativement diminuée après injection de sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux chez les souris déficientes en mastocytes en comparaison aux souris WT injectées avec les mêmes sérums de patients. La stimulation de mastocytes par l'IL-33 et les sérums de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux conduisait à une augmentation de production de molécules vasodilatatrices comme l'histamine. L'ensemble de ces données montre que l'augmentation de la perméabilité vasculaire après injection de sérum de patients avec vascularite est dépendante de l'IL-33 et des mastocytes.

Enfin, nous avons réalisé des cultures de fibroblastes en présence de sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux ou en présence de surnageants de culture de mastocytes activés par du sérum de patients ou du sérum de sujets sains. L'expression relative des ARNm de fibronectine, du collagène de type 1 et de l' α SMA était significativement augmentée pour les fibroblastes cultivés avec des surnageants de mastocytes incubés avec du sérum de patients ayant une vascularite (n=9) par rapport aux mastocytes incubés avec du sérum de sujet sain (n=3) et également par rapport aux fibroblastes incubés avec du sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux (n= 11) ou non simulés (n=3). En revanche, il n'y avait pas de différence de prolifération fibroblastique ou d'expression d' α SMA, qu'il s'agisse de mastocytes stimulés par l'IL-33 ou non. Nous n'avons pas mis en évidence de diminution de production de fibronectine, de collagène ou d' α SMA par les fibroblastes mis en présence d'inhibiteur de l'IL-33. Néanmoins, l'IL-33 était associée à une augmentation de PDGF α et de cytokines Th2, dont l'IL-13 (étude 1), positivement corrélée à la sévérité de la fibrose artérielle. Ces données suggèrent un effet profibrosant direct des mastocytes sur les fibroblastes et un possible effet fibrosant indirect de l'IL-33 par le biais de ses effets immunologiques.

Conclusion

Nos résultats préliminaires montrent que l'axe IL-33/ST2 et les mastocytes jouent un rôle essentiel pour promouvoir l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, l'activation endothéliale et pour réguler le remodelage tissulaire dans les vascularites des gros vaisseaux.

Cet article sera soumis pour publication en octobre 2017.

Présentation de l'article n°3 : Rôle des lymphocytes T folliculaires *helper* et des lymphocytes B dans la maladie de Takayasu

Justification

L'artérite à cellules géantes et la maladie de Takayasu partagent de nombreux points communs dans leur présentation clinique. Cependant, un certain nombre de points les différencie comme leur âge de survenue, leur association à des molécules CMH de classe II différentes, l'origine géographique des patients ou la localisation préférentielle des lésions artérielles. Nous n'avons que très peu de données sur les mécanismes physiopathologiques qui distinguent ces deux vascularites.

Objectif

Nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la réponse immune spécifiques à chacune de ces deux vascularites des gros vaisseaux.

Méthodes

Nous avons comparé les profils de différenciation et d'activation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ de patients ayant une maladie de Takayasu ou une artérite à cellules géantes, grâce à l'analyse des données transcriptomiques des lymphocytes T CD4⁺ et des CD8⁺. Nous avons effectué une analyse comparative de l'expression des ARNm des gènes des populations lymphocytaires triées T CD4⁺ et CD8⁺ de patients ayant une maladie de Takayasu (n=13) ou une artérite à cellules géantes (n=14), à l'aide de puces Illumina®.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons démontré que les lymphocytes T CD4⁺ purifiés de patients atteints d'artérite à cellules géantes et de patients ayant une maladie de Takayasu présentaient des profils d'expression de gènes distincts. Soixante-sept gènes étaient exprimés de manière

différentielle, parmi lesquels on retrouvait les gènes CXCR5, CCR6 et CCL20 qui étaient significativement up-régulés dans les lymphocytes T CD4⁺ de patients avec maladie de Takayasu en comparaison aux patients ayant une artérite à cellules géantes. L'analyse des mêmes données en analyse en composante principale a révélé que la signature de gènes qui permettait de mieux discriminer les deux maladies comprenait également les gènes CXCR5, CCR6, CCL20 et PD-1.

Nous avons ensuite confirmé ces données en PCR quantitative et en cytométrie en flux. Nous avons ainsi démontré que les lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺, définis comme les lymphocytes T folliculaires *helper* circulants (Tfhc), étaient significativement augmentés chez les patients avec maladie de Takayasu comparativement aux patients ayant une artérite à cellules géantes et aux donneurs sains en cytométrie en flux [proportion médiane des lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ de 15,4 % (10; 30,8) dans la maladie de Takayasu contre 5,3 % (1,4; 12,2) dans l'artérite à cellules géantes ($p < 0,0001$) et 9,7 % (5,6; 12,5) chez les sujets sains ($p = 0,0001$)]. Les lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ étaient également augmentés chez les patients avec maladie de Takayasu active en comparaison aux patients avec maladie inactive. Parmi les sous-populations de Tfhc, nous avons mis en évidence une augmentation des Tfh-17 (définis comme lymphocytes T CD4⁺ CXCR3⁻ CCR6⁺ CXCR5⁺) au sein des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients avec maladie de Takayasu ($p = 0,04$).

Nous avons également étudié la présence de Tfh au sein des lésions inflammatoires aortiques. L'analyse des lésions aortiques inflammatoires a ainsi révélé la présence d'organes lymphoïdes tertiaires, composés de cellules CD4⁺, CXCR5⁺, PD-1⁺ et CD20⁺ chez les patients ayant une maladie de Takayasu. Ces organes lymphoïdes tertiaires étaient significativement moins fréquents dans les lésions aortiques de patients avec une artérite à cellules géantes.

L'augmentation des Tfhc au niveau périphérique et la fréquence augmentée d'organes lymphoïdes tertiaires au niveau aortique chez les patients ayant une maladie de Takayasu

plaident en faveur de l'implication des lymphocytes B et de la coopération B/T dans la physiopathologie de la maladie de Takayasu. Nous avons donc étudié le phénotype lymphocytaire B chez ces patients. Nous avons ainsi démontré une augmentation des lymphocytes B périphériques (en nombre absolu et en proportion) chez les patients avec maladie de Takayasu par rapport aux patients avec une artérite à cellules géantes.

Nous avons ensuite étudié les propriétés fonctionnelles des Tfhc des patients avec maladie de Takayasu afin d'évaluer s'ils gardaient des caractéristiques similaires à celles des Tfh tissulaires. Les lymphocytes Tfh des patients Takayasu favorisaient la différenciation des lymphocytes B naïfs en B mémoires, leur prolifération et leur sécrétion d'immunoglobulines IgG. Le blocage de l'IL-21 était associé à une diminution des lymphocytes B CD27+.

Enfin, nous avons montré un lien étroit entre réponse Th17 et Tfh. Nous avons retrouvé une corrélation significative entre les taux sécrétés d'IL-21 (cytokine majeure de la différenciation Tfh) et d'IL-17. Le blocage d'IL-21 était associé à une diminution des lymphocytes T CD4+ sécrétant de l'IL-17 et *a contrario* à une augmentation des lymphocytes T régulateurs chez les patients avec maladie de Takayasu.

Conclusion

Nos résultats sur les données transcriptomiques objectivent un profil de différenciation des lymphocytes T CD4⁺ distinct dans la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes. L'augmentation des Tfhc au niveau périphérique et la fréquence augmentée d'organes lymphoïdes tertiaires au niveau aortique chez les patients ayant une maladie de Takayasu suggèrent fortement l'implication des Tfh dans la pathogenèse de cette maladie. Ces données soulèvent à nouveau la question d'un rôle éventuel d'une stimulation antigénique et de la coopération entre lymphocytes B et T aboutissant à la synthèse d'auto-anticorps.

Cet article a été écrit en vue d'une soumission dans *Circulation*.

Critical role of IL-33/ST2 axis and mast cells in regulating inflammation in large vessel vasculitis

AC Desbois^{1,2,3}, P Cacoub^{1,2,3}, AS Leroyer⁴, E Tellier⁴, M Garrido^{1,2}, A Maciejewski-Duval^{1,2},
C. Comarmond^{1,2,3}, S Barete³, M Arock^{5,6}, P Bruneval⁷, JM Launay⁸, P Fouret⁹, U Blank¹⁰,
M Rosenzweig^{1,2,3}, D Klatzmann^{1,2,3}, M Jarraya¹¹, P Cluzel¹², F Koskas¹³, G Kaplanski^{3,14}, D
Saadoun^{1,2,3}.

Running Title: IL-33 and mast cells in large vessel vasculitis

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR S 959, Immunology-Immunopathology- Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France;

² Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75651, Paris, France;

³ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, F-75013, Paris, France, Centre national de références Maladies Autoimmunes et systémiques rares et Maladies Autoinflammatoires rares

⁴ Aix-Marseille Univ; INSERM, Vascular Research Center of Marseille, UMR-S 1076, 13385 Marseille, France

⁵ Laboratoire de biotechnologies et pharmacologie génétique appliquée, CNRS UMR 8147, ENS - Ecole normale supérieure de Cachan, Cachan, France

⁶ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire d'Hématologie Biologique, Paris, France

⁷ Laboratoire d'anatomopathologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁸ INSERM, UMR-S 942, F-75010, Paris, France

⁹ Laboratoire d'anatomopathologie ; Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹⁰ Inserm U1149, CNRS ERL8252, Faculté de Médecine Site X. Bichat, Paris, France

¹¹ Banque des tissus Humains, Hôpital saint Louis, Paris, France

¹² Service de radiologie vasculaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹³ Service de Chirurgie vasculaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

¹⁴ APHM, CHU Conception, Service de Médecine Interne, Marseille, France

Correspondence: David Saadoun, MD, PhD, Department of Internal Medicine and Laboratory I3 « Immunology, immunopathology, immunotherapy » UMR 7211 (CNRS/UPMC) INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.

Phone: + (33)(1) 42 17 80 88. Fax: + (33)(1) 42 17 80 33. E Mail: david.saadoun@aphp.fr

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abbreviations: LVV: Large vessel vasculitis, GCA : Giant cell arteritis, IDO: Indoleamine-2, 3-deoxygenase, PBMC: peripheral mononuclear cells, MC: Mast cells, HD: Healthy donors, TA: Takayasu arteritis, Treg: Regulatory T cells

Abstract

Background: Polymorphisms in IL-33 gene have been associated with large vessel vasculitis (LVV). However, the mechanisms regulating inflammation in LVV are poorly understood.

Objectives: To assess the functional role of IL-33 on the regulation of immune response in LVV.

Methods: The impact of IL-33 on T cell homeostasis and cytokines production was determined in cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and aorta inflammatory lesions from 106 patients with LVV [Takayasu (n =54), and giant cell arteritis (n =52)] and 50 healthy donors, using Luminex assay, flow cytometry, quantitative RT-PCR and immunofluorescence analysis. The proportion of Tregs was also evaluated in cultures of mast cells (MC) and CD4⁺ T cells with or without IL-33 stimulation.

Results: IL-33 and its receptor ST2 were overexpressed in serum and in inflammatory aorta of LVV patients relative to controls. Mast cells (MC), one of main targets of IL-33, were also significantly increased in LVV aorta lesions compared to controls. Besides predominant production of Th1 and Th17 cytokines in LVV, we also showed increased levels of IL-4, IL-5 and IL-10 relative to HD (p<0.0001). IL-33 had a direct immunomodulatory impact by increasing Th2 and regulatory T cells in PBMC. IL-33 and MC further enhanced Th2 and regulatory responses by inducing a 6.1 fold increased proportion of Tregs (p=0.008) through increased indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) and IL-2 secretion. IL-33 mRNA expression was significantly correlated with the expression of IL-10 and TGF- β within aorta inflammatory lesions.

Conclusion: IL-33/ST2 axis and mast cells regulate inflammation in LVV.

Key messages:

- IL-33 and its receptor ST2 are overexpressed in serum and in inflammatory aorta of LVV patients
- Levels of IL-4, IL-5 and IL-10 are significantly increased relative to controls and are correlated with activity of LVV
- IL-33 and mast cells induce a Th2 response and significantly increased proportion of Tregs through increased indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) and IL-2 secretion.

Capsule Summary:

IL-33 and mast cells are mainly known to enhance an inflammatory response in allergy. Our data show a critical role of IL-33 and mast cells in regulating immune response in large vessel vasculitis.

Key words: IL-33, mast cells, Treg, immunoregulation, vasculitis.

Introduction

Large vessel vasculitis (LVV) mainly include giant cell arteritis (GCA) and Takayasu arteritis (TA). LVV may lead to segmental stenosis, occlusion, dilatation and/or aneurysm formation in the aorta and/or its main branches¹⁵⁴. Histological lesions are characterized by an inflammatory infiltrate located mainly in the inner part of aortic wall (media) associated with a fragmentation of the internal elastic lamina and hyperplasia of vaso vasori in GCA. TA lesions may affect the 3 tunics but predominate in the media and adventitia. The pathogenesis of LVV is still unknown to date. Previous studies have provided evidence that LVV inflammation was driven by Th1 and Th17 cells in the peripheral blood and inflamed tissues¹⁵⁵. However, the pathological mechanisms and cytokines implicated in the regulation of unbalanced Th1 and Th17 responses are poorly understood.

Interleukin 33 (IL-33), a recently identified cytokine belonging to the IL-1 family, is implicated in many biological processes⁴². Unlike most cytokines, IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of epithelial, endothelial cells and also fibroblasts. IL-33 is an “alarmin”, as it is secreted secondary to cell apoptosis and necrosis. During apoptosis IL-33 is cleaved by caspase 3 or 7, leading to diminished biological activity in vivo and increased susceptibility to protease degradation. However, during necrosis or tissue damages, IL-33 is released and acts as a cytokine. IL-33 binds to a heterodimeric receptor called ST2 or IL1RL1, expressed on Th2 cells, regulatory T cells (Tregs), mast cells, eosinophils, basophils, ILC2s and NK cells⁴¹. During inflammation, several mechanisms allow the regulation of IL-33 effects, such as sST2, a soluble form of ST2 acting as a decoy receptor that inhibits IL-33 signalling. Many studies have demonstrated that IL-33 potently enhances the activity of the immune system and is a key regulator of the immune response, involved in many autoimmune and inflammatory disorders.

To date, only few data exist on the implication of IL-33 in LVV. Ciccia et al. have reported an overexpression of IL-33 within inflammatory lesions of temporal arteries¹⁵³. A meta-analysis has found an association of GCA and an IL-33 genetic variant¹⁵⁶. However, the functional role of the IL-33/ ST2 in LVV patients is unknown. Herein, we aimed at assessing the role of IL-33/ST2 in the regulation of immune response in LVV.

Methods

Patients

The study population consisted of 54 adult TA patients (median [IQR] age at diagnosis: 32.4 [27.3; 53.2] years) and 52 GCA patients (median [IQR] age at diagnosis: 74.7 [66.3; 83.2] years), fulfilling the international criteria for TA and GCA, respectively^{157,158}. All TA patients were evaluated by National Institute of Health (NIH) criteria for disease activity¹⁵⁹. Clinical characteristics of LVV patients are indicated in **Table 1**. Blood samples from 50 age and sex-matched healthy donors (HD) were obtained from Etablissement Français du Sang (Hôpital Pitié-Salpêtrière). The study was approved by our institutional ethics review board and was performed according to the Helsinki declaration. Donors gave informed consent.

Analysis of cytokine production

Levels of IL-33 in sera were performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D systems) in LVV patients and HD. ST2 level in sera was performed using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, R&D systems) in TA and GCA patients and HD. Quantitative determination of IFN γ , IL-17, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 was performed in culture supernatant using Human Cytokine 25-Plex (Invitrogen, France) in accordance with the manufacturer protocol.

For intracellular staining, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated for 4 hours with 0,05 μ g/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mM (1 μ g/mL) ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of brefeldin A (BD Pharmingen) and were stained with the following conjugated monoclonal antibodies, at predetermined optimal dilutions, for 15 minutes at room temperature: CD3-APC-Alexa Fluor 750, CD4-ECD, CD8-APC-Alexa Fluor 700, (Beckman Coulter). Intracellular detection of IL-4-PE (BD, France), IFN γ -FITC (Miltenyi Biotec), TNF α -PE (Miltenyi Biotec), IL17-eFluor 660 (ebioscience), IL-10-APC (BD, France) was performed on fixed and permeabilized cells using appropriate buffer (BD Pharmingen).

For analysis of regulatory T cells (Tregs), intranuclear detection of FOXP3-AF647 (Beckman Coulter), with CD3-FITC (Beckman Coulter), CD8-KO (Beckman Coulter), CD4-PB (Beckman Coulter), CD127-PC7 (Beckman-Coulter), CD25-PE (BD) was performed using PerFIX-nc Kit (Beckman Coulter). Data were acquired using a Navios flow cytometer and analyzed with the Kaluza analysis software (Beckman Coulter).

T cell differentiation with IL-33

PBMCs of LVV patients were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2% penicillin-streptomycin (1 x 10⁶ cells/ml) and stimulated in 48-well plates coated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies with or without 10ng/mL human recombinant IL-33 (eBiosciences). After 3 and 5 days of culture, culture supernatants were harvested and immediately frozen. Quantitative determination of IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 and IFN γ , IL17 in culture supernatant was performed using Human Milliplex® kit (Merck Millipore, France) in accordance with the manufacturer protocol.

To evaluate the impact of IL-33 on regulatory T cells (Tregs), PBMC from LVV patients were cultured for 5 days in 48-well plates coated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies with or without 10ng/mL human recombinant IL-33. The proportion of CD4⁺ CD25^{High} CD127^{Low} FOXP3 cells among TCD4⁺ cells was assessed by flow cytometry as described previously. In order to investigate the impact of mast cells on Tregs in presence of IL-33, CD4⁺ T cells (1×10^6) of LVV patients were purified from frozen PBMC according the instructions of the manufacturer (EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Enrichment Kit - STEMCELL) and were co-cultured in 24-well plates coated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies for 4 days with or without human ROSA^{KITWT 160} mast cells (2.5×10^5) in the presence or the absence of recombinant IL-33. The proportion of FOXP3⁺ CD25^{High} CD4⁺ cells in each condition was assessed by flow cytometry as described previously.

Assessment of IDO activity

The kynurenin to tryptophan ratio was used as a surrogate indicator of IDO activity. Levels of tryptophan and kynurenin were analyzed by isocratic liquid chromatography with coulometric detection¹⁶¹.

Immunofluorescence analysis

Detection of IL-33⁺, ST2/IL-1RL1⁺, CD3⁺, FOXP3⁺, Tryptase⁺, IL-10⁺, and IL-4⁺ cells was performed on fixed, paraffin-embedded samples from 5 temporal arteries and 13 aorta of GCA patients with active inflammatory arterial lesions, 15 aorta of TA patients, 5 temporal arteries of controls and 3 non-inflammatory aorta. After dewaxing in baths of xylene and ethanol, slides were submitted to antigen retrieval by heating in citrate buffer pH 6.0. Before incubation with primary antibodies, Fc receptor was blocked with normal goat serum 5%. Slides were incubated over night with monoclonal mouse anti-human CD3 (dilution 1:50, Abcam) rabbit polyclonal anti Von Willebrand Factor (dilution 1:250, Dako Cytomation), mouse monoclonal anti-IL-33 (dilution 1:1000, Enzo Life Sciences), rabbit polyclonal anti-ST2 (dilution 1:100, Sigma-Aldrich), rabbit polyclonal anti-IL-4 (dilution 1:50, Abcam), rabbit polyclonal anti IL-10 (dilution 1:25, Abcam), rat monoclonal anti-FoxP3 (1:100, eBioscience), mouse anti-tryptase (1:400, DAKO) or with isotype control : polyclonal Rabbit IgG or monoclonal mouse IgG (Abcam) or monoclonal rat IgG (eBioscience). Slides were then incubated for 2 hours at room temperature with Cy3-conjugated goat anti-mouse (working dilution 1:1000, Jackson ImmunoResearch) and Alexa 488 donkey anti- rabbit (working dilution 1:1000, Life Technologies), mounted in Mowiol, and evaluated under fluorescence microscopy.

Gene expression quantification at the mRNA level in aortic tissues

Quantification of mRNA expression was performed on paraffin-embedded aorta samples from GCA (n=20) patients, TA (n=11) patients and non-inflammatory aorta controls (n=3). IFN γ , IL-1 β , IL-10, TNF α , IL-6, GATA-3, FOX-P3, T-BET, ROR- γ t, VEGF, PDGF α , PDGF β , CCL-2, CCL-3, IL-8, CXCR-5, PD-1, CD-45 genes were analyzed. The theoretical and practical aspects of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA) have been described in detail elsewhere (13). Briefly, total RNA was

extracted using the High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche) and was reverse-transcribed before real-time PCR amplification. Quantitative values were obtained from the threshold cycle (Ct) number at which the increase in the signal associated with exponential growth of PCR products began to be detected using analysis software, according to the recommendations of the manufacturer (PerkinElmer Applied Biosystems). The precise amount of total RNA added to each reaction mixture (based on optical density) and its quality (i.e., lack of extensive degradation) were both difficult to assess. We therefore also quantified transcripts of the *RPLP0* gene, which encodes the ribosomal protein subunit P0, as the endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its *RPLP0* content and the expression of CD45. Results, expressed as fold differences in target gene expression relative to the *RPLP0* gene (termed *Ntarget*), were determined using the formula $Ntarget = 2^{\Delta Ct_{sample}}$. The ΔCt value of the sample was determined by subtracting the Ct value of the target gene from the Ct value of the *RPLP0* gene. The *Ntarget* values of the samples were subsequently normalized to obtain a 'basal mRNA level' (smallest amount of mRNA quantifiable (Ct = 35)) equal to 1. Primers for *RPLP0* and the 19 target genes were chosen using Oligo, version 6.0 (National Biosciences, Plymouth, MN). To avoid amplification of contaminating genomic DNA, 1 of the 2 primers was placed at the junction between 2 exons. The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 50 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute.

Culture of temporal arteries

Temporal arteries of GCA patients (n=8) and controls (n=5) were cultured for 24 hours without or with 10ng/ml recombinant human IL-33 for 24 hours. Temporal arteries were then incubated for 24h in RNAlater at +4°C and then frozen at -80°C. Culture supernatants were collected and immediately frozen at -80°C. The determination of cytokines dosages in supernatants was performed using Milliplex® kit (Merck Millipore, France) in accordance with the manufacturer protocol. Temporal arteries were lyzed and homogenized. Total RNA was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse-transcribed using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) both according to the manufacturer's instruction. Gene expression was determined by real-time PCR. Each cDNA sample was amplified in triplicate using SYBR Green (Applied Biosystems) on 7500 FAST Real-time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute. Quantitative values were obtained from the threshold cycle (Ct) number at which the increase in the signal associated with exponential growth of PCR products began to be detected. *GADPH* gene was used as an endogenous control and each sample was normalized on the basis of its *GADPH* content and the expression of CD45. The primers were designed to span introns and are listed in supplementary Table.

Statistics

Continuous variables are presented with the median and range or with the mean±SEM. Categorical variables are presented with counts and proportions. Statistical comparisons were performed by using the Mann-Whitney test for quantitative unpaired data, and the Wilcoxon matched pairs test for quantitative paired data. All statistical tests were two-tailed with a significance level of 0.05. Statistical significance was evaluated using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

IL-33 and its receptor ST2 (IL-1RL1) are overexpressed in LVV and are correlated with vascular complications

A significant increased level of IL-33 was observed in sera of GCA and TA patients as compared to healthy donors (HD) (449.4 ($\pm$ 894.9) vs 155 ($\pm$ 361.5) vs 67.7 ($\pm$ 204.6) pg/mL, $p=0.01$ and $p=0.002$, respectively) (**Figure 1A**). Mean level of IL-33 was further increased in LVV patients with vascular complications and/or aortitis (i.e stroke, optic ischemic neuropathy, myocardial infarction) as compared to those without ($p=0.03$) (**Figure 1B**). Consistently, mean level of soluble ST2 was increased in sera of GCA patients ($n=38$) as compared to TA ($n=17$) and HD ($n=17$) [2808.7 ($\pm$ 2839.7) vs 964.1 ($\pm$ 920) pg/ml in TA and 677.7($\pm$ 660.5) in HD, $p<0.0001$] (**Figure 1C**).

Immunofluorescence analyses of temporal arteries and aorta tissue specimens from LVV patients and controls were used to investigate the expression pattern of IL-33 and ST2. IL-33 was mainly expressed within adventitial vessels in co-localization with endothelial cells [i.e. von willebrand factor (WF)] and in a lesser extent within few inflammatory cells. Expression of ST2 was observed within the inflammatory infiltrates of arteries of LVV patients (**Figure 1D**). The proportion of IL-33 positive vessels was higher in aorta ($n=10$) of LVV patients as compared to controls ($p=0.007$) (**Figures 1E**). The proportion of vessels with positive IL-33 staining was also higher in temporal arteries ($n=5$) of GCA patients as compared to control arteries ($p=0.016$) (**data not shown**). Consistently, IL-33 and ST2 mRNA were overexpressed [1.2 ($\pm$ 0.5) and 11.1 ($\pm$ 20.4), $p=0.02$, respectively] in LVV aorta as compared to non-inflammatory aneurysms (**Figure 1F**).

Expression of Th2 and regulatory cytokines production in LVV

We evaluated the level of Th2 cytokines in culture supernatant of PBMC after 4 hours of PMA-ionomycin stimulation. Comparisons of cytokines between LVV patients and HD are presented in **Figures 2A, B and C**. Active LVV patients had significantly increased median levels of IL-4 [54.2 ($\pm$ 50.8) vs 25.8 ($\pm$ 37.4) pg/mL, $p=0.003$], IL-5 [21.3 ($\pm$ 26.1) vs 4.1 ($\pm$ 5.9) pg/mL, $p<0.0001$] and IL-10 [54.9($\pm$ 84.7) vs 8.5($\pm$ 17), $p<0.0001$] as compared to HD. Consistently, the quantitative analysis of mRNA within inflammatory lesions of LVV aorta

revealed an overexpression of GATA 3 (5.2 ± 4.5), as compared to controls with non-inflammatory aorta aneurysms ($p=0.006$) (**Figure 2D**). Immunofluorescence analyses of aorta tissue specimens from patients with LVV also revealed an expression of IL-4 and IL-10 (**Figure 2E**). The quantitative analysis of mRNA within inflammatory lesions of LVV aorta revealed an overexpression of IL-10 (1.8 ± 1.2), and FOXP3 (44.2 ± 55.2 , $p=0.005$), as compared to controls with non-inflammatory aorta aneurysms (**Figure 2F**). Within inflammatory lesions, immunofluorescence analysis of aorta in patients with LVV revealed that Tregs (as defined as positive FOXP3 cells) expressed ST2 and IL-10 (**Figure 2G**).

IL-33 predominantly induces a Th2 and regulatory immune responses in LVV

Through ST2 binding, IL-33 induces helper T cells, mast cells and eosinophils to produce type 2 cytokines. We next attempted to determine whether IL-33 overexpression was accompanied by an increased in Th2 cytokines in LVV. Freshly isolated PBMC from LVV patients (with corticosteroids $<15\text{mg/day}$) and controls were cultured with anti-CD3/CD28 with or without IL-33 stimulation for 3 and 5 days. The secretion of cytokines was evaluated by flow cytometry (**Figure 3A**) and by quantitative determination in culture supernatants (**Figure 3B**) after 5 days of culture of PBMC with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies. The proportion of CD4^+ cells secreting IL-4 was increased after IL-33 stimulation [$10.5 (\pm 12.3)$ vs $7.6 (\pm 10.2)$, $p=0.01$] in LVV patients but not in healthy donors (**Figure 3A**). IL-33 stimulation led to a significant increase of IL-5, IL-4 and IL-13 production in culture supernatants of PBMC after 5 days of culture with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies [$376 (\pm 246.4)$ pg/ml with IL-33 vs. $225.8 (\pm 195.4)$ pg/ml without IL-33, $p=0.0001$ and $19.3 (\pm 16)$ with IL-33 vs $16 (\pm 12.7)$ without IL-33, $p=0.03$ and $1347.6 (\pm 660)$ with IL-33 vs $1176.6 (\pm 620.8)$ without IL-33, $p=0.008$, respectively], but not of IFN_γ , IL-17 and IL-10 (**Figure 3B**).

Since regulatory T cells (Treg) may express ST2, we next studied the impact of IL-33 on the proportion of Tregs. We have shown that IL-33 induced an increased proportion of Tregs after 5 days of PBMC culture ($p=0.0004$) (**Figure 3C**). In addition, Tregs expanded by IL-33 were functional (i.e. assessed by their ability to inhibit effector T cells proliferation) (**data not shown**).

We next assessed by quantitative PCR (qPCR) the expression of IL-33, ST2, Th1 and Th2 cytokines within inflammatory aortic lesions of 18 GCA patients who underwent a surgical repair for an aortic aneurysm/dissection. Relative expression of IL-33 mRNA was significantly

correlated with the expression of IL-10 and TGF- β mRNA [$r=0.6$ ($p=0.008$) and $r=0.8$ ($p<0.0001$), respectively] (**Figure 3D**). Relative expression of IL-33 was not correlated with the expression of T-Bet, ROR γ t, GATA3, IFN γ , IL-6 and IL-8. Altogether, these data suggest a significant correlation between IL33/ST2 axis and regulatory immune response in vivo. To further precise the impact of IL-33 on the immune response within inflammatory lesions, we assessed the secretion of cytokines secreted by GCA temporal arteries ($n=8$) stimulated or not by IL-33. IL-33 stimulation tended to be associated with increased production of IL-10 by temporal arteries measured by both quantitative determination of cytokines in culture supernatants [$51.4 (\pm 66.1)$ vs $18.8 (\pm 12.9)$] and qPCR [relative expression of $1.9 (\pm 1.1)$] from temporal arteries (**data not shown**). IL-33 did not increase the production of IFN γ , IL-4, IL-5, IL-13, nor IL-6 in temporal arteries.

Critical role of IL-33 and mast cells through indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) and IL-2 in immune regulation in LVV

As mast cells (MC) represent one of the main targets of IL-33, we further studied whether MC could also enhance a regulatory immune response in patients with LVV. First, we demonstrated the presence of MC within inflammatory infiltrates of LVV aorta. Some mast cells had positive staining for IL-33 receptor (ST2) (**Figure 4A**). We have also shown by immunofluorescence an increased number of mast cells in LVV lesions within the aorta as compared to non-inflammatory controls [$51.6 (\pm 53.5)$ vs $3.3 (\pm 3.5)$, $p=0.01$] (**Figure 4B**).

Next, we have evaluated the impact of MC and IL-33 on Tregs. CD4⁺ cells of 8 LVV patients (treated with corticosteroids $< 10\text{mg/day}$) stimulated with $\alpha\text{CD28}/\alpha\text{CD3}$ were cultured alone or combined with MC with or without IL-33 for 4 days. The proportion of Tregs was determined in each condition. We observed an increase of Treg when stimulated CD4⁺ cells of LVV patients were cultured with MC as compared to the condition without MC. The addition of IL-33 to MC further increased the proportion of Treg as compared with the conditions including CD4⁺ T cells alone and CD4⁺ T cells plus MC [median proportion of CD25^{hi}FOXP3⁺CD4⁺T cells of $1.88 (0.34; 8.85)\%$ in CD4⁺ T cells alone vs $5.57 (2.38; 7.79)\%$ in CD4⁺ T cells plus MC and $11.02 (1.7; 14.84)\%$ in CD4⁺ T cells plus MC with IL-33 ($p=0.02$ and 0.008 , respectively)]. Altogether, these results show that MC and IL-33 enhance a regulatory immune response (**Figures 4C, D and E**).

Quantitative determination of cytokines was also performed in coculture supernatants of MC and CD4⁺T cells (n=8). IL-33-stimulated MC led to a significant increase of IL-2 secretion [136.4 ($\pm$ 167.4) in CD4 T cells alone vs 2080 ($\pm$ 2808.9) in CD4 T cells with MC vs 3555.4 ($\pm$ 5062) in CD4 T cells, MC and IL-33, $p=0.008$ and 0.03], which may explain the increase of Tregs by MC and IL-33 (**Figure 4F**). Consistently, we found an increased activity of indoleamine 2 3-dioxygenase (IDO) in MC incubated with LVV serum and IL-33 as compared to those not stimulated with IL-33 [9 (6.7; 15.4) vs 5.8 (2.4; 10.8), $p=0.001$] (**Figure 4G**).

Finally, we studied the impact of IL-33 and MC on Th2 immune response. IL-33-stimulated MC led to a significant increase of IL-5 [144.7 ($\pm$ 121) in CD4 T cells vs 634.8($\pm$ 671.5) in CD4 T cells and MC vs 1168.2 ($\pm$ 1461.5) in CD4 T cells, MC and IL-33, $p=0.008$], IL-13 [1895.4 ($\pm$ 1296.6) in CD4 T cells vs 4643.2 ($\pm$ 3375.5) in CD4 T cells and MC vs 9800 ($\pm$ 9548.4) in CD4T cells, MC and IL-33, $p=0.008$ and 0.03] and IL-4 [74.6 ($\pm$ 79.9) in CD4 T cells vs 291.5($\pm$ 410.1) in CD4 T cells and MC vs 499.5 ($\pm$ 585.9)in CD4 T cells, MC and IL-33, $p=0.03$] (**Figures 4 H, I and J**).

Discussion

Few data exist on the implication of IL-33 in LVV. A meta-analysis has found an association of GCA and an IL-33 genetic variant¹⁵⁶. However, the functional role of the IL-33/ ST2 in LVV patients is unknown. We have shown intravascular IL-33 staining filled the vessel lumen and colocalized with endothelial cells in aorta of LVV patients. Consistently, Ciccia et al have previously found overexpression of IL-33 in the inflamed temporal arteries of patients with giant cell arteritis¹⁵³. IL-33 was initially described abundantly expressed in high endothelial venules, specialized blood vessels mediating lymphocyte recruitment into lymph nodes¹⁶². IL-33 is constitutively expressed by endothelial and epithelial cells and released by these cells following necrotic cell death¹⁶³. In human endothelial cells, IL-33 induce increased vascular permeability and stimulation of angiogenesis⁴³. IL-33 was found in vascular endothelial cells¹⁶⁴, coronary artery endothelium¹⁶⁵ and vascular smooth muscle cells¹⁵³ and was shown to induce the production of cytokines from human mast cells and T cells⁴⁷.

We next attempted to determine whether IL-33 overexpression was accompanied by an increased in Th2 cytokines in LVV. In hematopoietic cells, IL-33 is known to act primarily on immune cells associated with type 2 response^{39,42}. Through ST2 interactions IL-33 induces helper T cells, mast cells and eosinophils to produce type 2 cytokines. Indeed, Th2 cells express constitutively high levels of ST2. In Th2 GATA3⁺ cells, combined IL-33 and IL-2/STAT5 increase the expression of GATA-3 and hence promote Th2 program and enhance also the expression of ST2⁴⁰. Tissue cytokine profiles in aorta of LVV suggest that Th1 and Th17 cytokines drive disease lesions¹⁵⁵ whereas a possible contribution of the Th2 subset in large vessel vasculitis lesions formation has never been evidenced. Herein, the analysis of cytokine production in LVV patients pointed a secretion of type 2 immune response cytokines with a significant increase production of IL-4 and IL-5 by PBMC of LVV patients in comparison to healthy controls. In addition, we observed an expression of IL-4 and IL-10 within the inflammatory arterial infiltrates of LVV patients. IL-33 stimulation led to a significant increase of IL-5, IL-4 and IL-13 production by PBMC of LVV patients as compared to the changes observed in IL-17, TNF α or IFN γ expression. IL-33 has been shown to exert protective effects in atherosclerosis mice through a switch from a pro-atherosclerotic Th1 type to a protective Th2 type immune response¹¹. In cardiovascular disease models, IL-33 induction following vascular and cardiac stress was correlated with improved outcomes^{11,3,15 12, 27}. IL-33 reduced atherosclerosis¹¹, improved cardiac function after myocardial infarction²⁷ and limited pressure

overload induced cardiac hypertrophy¹². Taken together, the production of Th2 cytokines may tilt the Th1 and Th17 immune responses observed in LVV patients.

We have shown that IL-33 was associated with a regulatory immune response in both peripheral blood and inflammatory infiltrates within pathological arteries of LVV patients. Within inflammatory lesions of aorta in LVV patients, the expression of IL-33 mRNA was correlated with those of TGF- β and IL-10 mRNA. Consistently, the addition of human rIL-33 to GCA temporal arteries was associated with an increased expression of IL-10 mRNA measured by qPCR and an increased level of IL-10 protein in culture supernatants.

Besides Th2 polarization, IL-33 acts primarily on regulatory immune responses, through mast cells and Tregs^{42,166}. Tregs express constitutively high levels of ST2, IL-33 enhances FOXP3 expression and thereby Treg program and also boosts the expression of ST2⁴⁰. Tissue Tregs are highly suppressive and express IL-10. In inflammatory bowel diseases, ST2 is preferentially expressed on colonic Treg cells¹⁶⁷ and IL-33 through ST2 promotes Treg function and adaptation to the inflammatory environment. IL-33 signalling enhances TGF β -mediated differentiation, accumulation and maintenance of Treg in inflamed tissue. IL-23, a key pro-inflammatory cytokine in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, restrained Treg responses through inhibition of IL-33 responsiveness¹⁶⁷.

Consistently, we have shown by immunofluorescence an increased number of mast cells in LVV lesions within the aorta and temporal arteries as compared to healthy donors. Expression of ST2 within the inflammatory arterial infiltrates colocalized with mast cells and Tregs. We have found that IL-33 and mast cells synergize the expansion of Treg as compared to the condition with CD4⁺ T cells alone. Higher levels of IDO and of IL-2 were observed after stimulation of mast cells with IL-33. These two molecules are critical in the homeostasis of Tregs¹⁶⁸ and may be key mediators of the Treg expansion observed in presence of IL-33 and MC. Although mast cells are known to contribute to inflammation in many conditions such as allergy or rheumatoid arthritis⁵⁰, other reports suggest that MC are also critical in enhancing a regulatory immune response^{169–171}. Consistently, MC were found to be crucial for skin allograft tolerance in mice, via Treg-secreted IL-9 which leads to activation and recruitment of MC¹⁶⁹. Rodrigues et al. recently found that dendritic cells with direct contact with MC expressed higher levels of PDL1, secreted higher levels of indoleamine-2, 3-deoxygenase (IDO) and stimulated regulatory T lymphocytes producing IL-10 and TGF- β ¹⁷⁰. In a model of papain-induced allergy, MC stimulated with IL-33 have been shown to be crucial to suppress papain-

induced inflammation by promoting regulatory T cells¹⁷². IL-33 was shown to both enhance airway eosinophilia and inflammation through ILC2 stimulation but also to lead to increased Treg number through MC and IL-2¹⁷².

In conclusion, our results demonstrate an unrecognized link between an endogenous mediator of tissue damage and a major anti-inflammatory pathway in LVV. We provide evidence that IL-33/ST2 axis and mast cells exert a critical role in regulating inflammation in LVV through their action on Th2 and Tregs cells.

Acknowledgments

We thank all patients and all physicians involved in the care of the patients. We also thank Fabien Pitoiset, Gaith Wedeh, Sophie Vacher, Ivan Bièche, Thomas Vazquez, Guillaume Churlaud, Michele Barbié, Nathalie Ferry, Cornelia Degbe, Sylvain Porrot, and Valentin Quiniou for their input in conducting experiments. We also thank “la fondation pour la recherche médicale”.

-

Figure legends:

Figure 1: IL-33 and its receptor ST2 (IL-1RL1) were overexpressed in LVV

- Expression level of IL-33 in TA (n=27) and GCA (n=61) patients serum was higher compared to HD (n=18), * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$.
- Mean level of IL-33 was further increased in patients with vascular complications (n=18) and/or aortitis as compared to those without (n=11), * $P < 0.05$.
- Mean level of soluble ST2 was increased in GCA patient sera (n=38) as compared to HD (n=17), *** $P < 0.001$.
- Immunofluorescence analyses of temporal arteries and aorta tissue specimens from LVV patients revealed that IL-33 was mainly expressed within adventitial vessels and co-localized with endothelial cells with positive von willebrand factor (WF) staining. Expression of ST2 was mainly observed within the inflammatory infiltrates.
- The proportion of vessels with positive IL-33 staining was higher in aorta from LVV patients (n=10) as compared to those of controls (n=3), ** $P < 0.01$.
- The relative expression of ST-2 and IL-33 mRNA in LVV patients (n=31) as compared to non-inflammatory aorta (n=4).

These data are shown as the mean $\pm$ SEM

Figure 2: Expression of Th2 and anti-inflammatory cytokines in LVV

- a-c. PBMC of active LVV patients (aLVV) (n=24) and HD (n=50) were stimulated for 4 hours with PMA-ionomycin. Expression levels of interleukin 4 (IL-4), interleukin 5 (IL-5) and interleukin 10 (IL-10) measured in supernatant are represented. The levels of IL-4, IL-5 and IL-10 are higher in LVV patients as compared to HD. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- d. Relative expression of GATA3 measured in aorta inflammatory lesions of LVV patients (n=31) as compared to aorta controls (n=4). ** $P < 0.01$
- e. Immunofluorescence analysis of inflammatory lesions from LVV patients reveals the expression of Th2 (here IL-4) and IL-10 cytokines by CD3 positive cells.
- f. Relative expression of TGF- β , FOXP3 and IL-10 mRNA measured in aortic inflammatory lesions of LVV patients (n=31) as compared to aorta controls (n=4). ** $P < 0.01$
- g. Expression of ST2 and IL-10 by Treg (defined as FOXP3 cells) by immunofluorescence analysis.

Figure 3: IL-33 predominantly induced a Th2 and regulatory immune response in LVV

- Freshly isolated PBMC from LVV patients (with corticosteroids <15mg/day) were cultured with anti-CD3/CD28 with or without IL-33 stimulation for 3 and 5 days. Left panel: Dot plots representing IFN γ and IL-4 secreting CD4 $^{+}$ T cells with or without IL-33 stimulation. Right panel: The secretion of Th1 and Th2 cytokines was assessed by flow cytometry. The proportion of IL4-secreting CD4 $^{+}$ T cells was increased with IL-33 stimulation ($p=0.01$) in GCA patients (n=8). These data are shown as the mean $\pm$ SEM.
- After 5 days of culture, quantitative determination of cytokines was performed in culture supernatants (n=19) of LVV PBMC. IL-33 stimulation led to a significant increase of IL-5, IL-4 and IL-13 secretion, * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.
- Left panel: Dot plots representing CD25 High FOXP3 $^{+}$ and CD127 low FOXP3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ cells are shown. On the left, PBMC of one LVV patient are cultured for 5 days without IL-33. The frequency of CD25 High FOXP3 $^{+}$ and CD127 low FOXP3 $^{+}$ CD4 $^{+}$ cells is shown. On the right, PBMC of the same LVV

patient were cultured for 5 days with IL-33. Right panel: Corresponding results of 22 LVV patients. The frequency of Tregs was increased in stimulated PBMC with IL-33 as compared to those without IL-33. These data are shown as the mean $\pm$ SEM

- d. We next assessed by quantitative PCR the expression of IL-33, ST2 and Th1 and Th2 cytokines within GCA aortic lesions (n=18). Relative expression of IL-33 mRNA was significantly correlated with the expression of IL-10 mRNA [$r=0.6$ ($p=0.008$)]. Relative expression of IL-33 mRNA was significantly correlated with the expression of TGF- β mRNA [$r=0.8$ ($p<0.0001$)].

Figure 4: IL-33 enhanced a regulatory and Th2 immune response through MC

- a. Immunofluorescence staining of LVV inflammatory lesions showed expression of ST2 on MC
- b. The number of MC within aorta was higher in LVV patients (n=14) than in non-inflammatory controls (n=3) * $P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- c. Dot plots representing the proportion of CD25^{High}FOXP3⁺ and CD127^{low}FOXP3⁺ CD4⁺ cells are shown. On the top: CD4⁺ T cells of 1 TA patient are cultured for 5 days without IL-33. The proportion of CD25^{High}FOXP3⁺ and CD127^{low}FOXP3⁺ CD4⁺ cells is shown. On the middle: MC and stimulated CD4 T cells were cultured for 5 days without IL-33. On the bottom: MC and stimulated T CD4 cells were cultured for 5 days with IL-33.
- d and e. The corresponding results of 8 LVV patients. MC alone and IL-33-stimulated MC promote the increase of Tregs frequency. These data are shown as means $\pm$ SEM, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- f. Quantitative determination of cytokines was performed in culture supernatants (n=8). IL-33-stimulated MC led to a significant increase of IL-2 secretion. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- g. MC were incubated with LVV serum (n=11) with or without IL-33 stimulation. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity was increased in MC incubated with IL-33 as compared to those not stimulated with IL-33. *** $P<0.001$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- h,i,j. Quantitative determination of Th2 cytokines in culture supernatants (n=8) of MC and CD4⁺ T cells. IL-33-stimulated MC led to a significant increase of IL-5, IL-13 and IL-4 secretion. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM

Table 1: Main demographical and clinical characteristics of LVV patients

Parameters	TA N=54	GCA n=52
Demographic features		
Median age [IQR]	32.4 [27.2; 53.2]	74.7 [66.3; 83.2]
Female gender	43 (79.6%)	35 (67.3%)
Geographic origin		
Caucasian	19 (35.2%)	50 (96.2%)
African	15 (27.8%)	0 (0%)
North African	15 (27.8%)	2 (3.8%)
Other	5 (9.2%)	0 (0%)
Clinical features		
Numano Classification		
I	7 (14.3%)	NA
II	8 (16.3%)	NA
III	5 (10.2%)	NA
IV	1 (2%)	NA
V	27 (55%)	NA
Ischemic cardiac disease	6 (11.1%)	NA
Stroke	12 (22.2%)	7 (13.4%)
Aortic aneurysms	18 (33.3%)	4 (7.7%)
Aortitis	NA	14 (26.9%)
Ocular complications	NA	5 (9.6%)

Figure 1

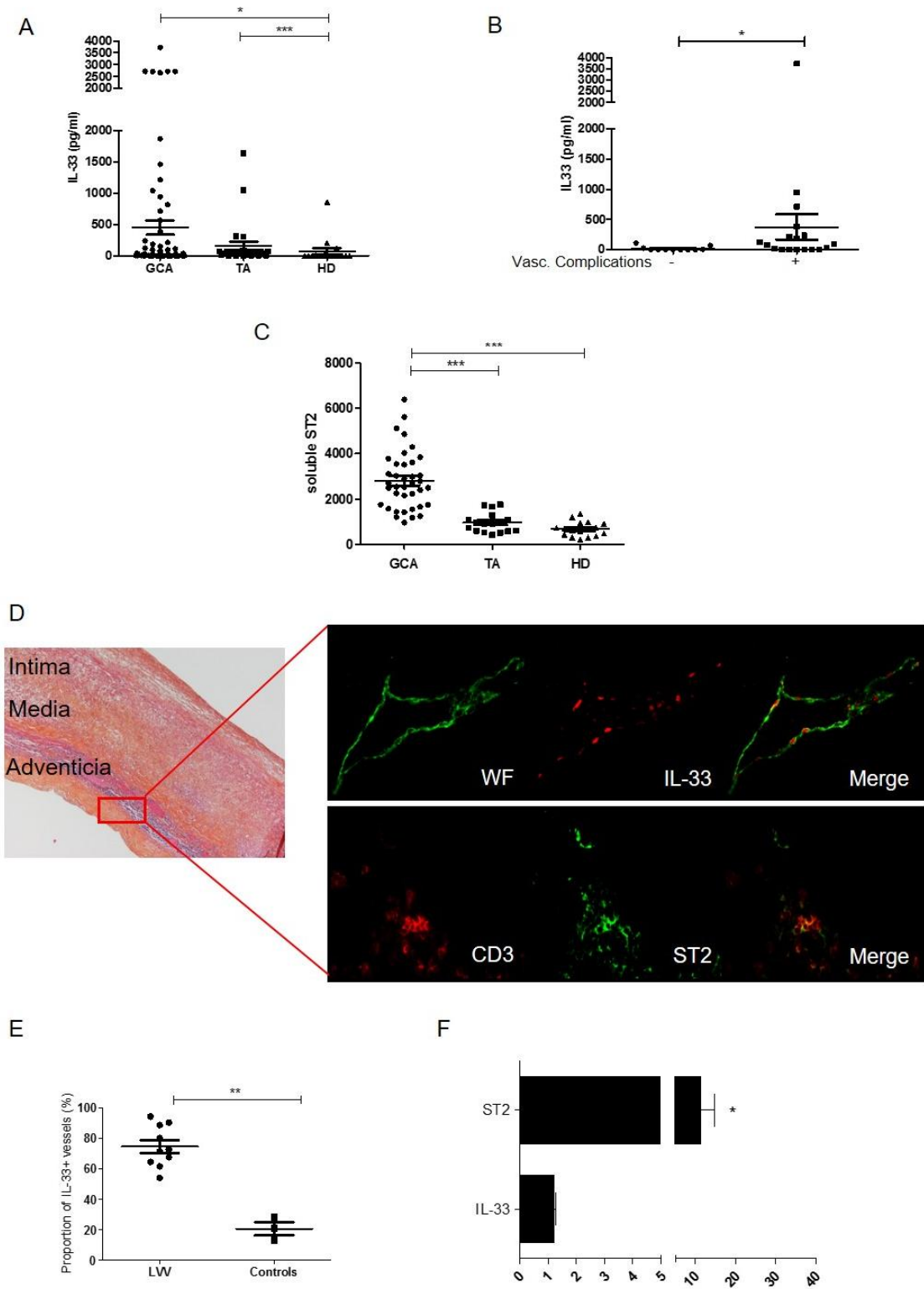


Figure 2

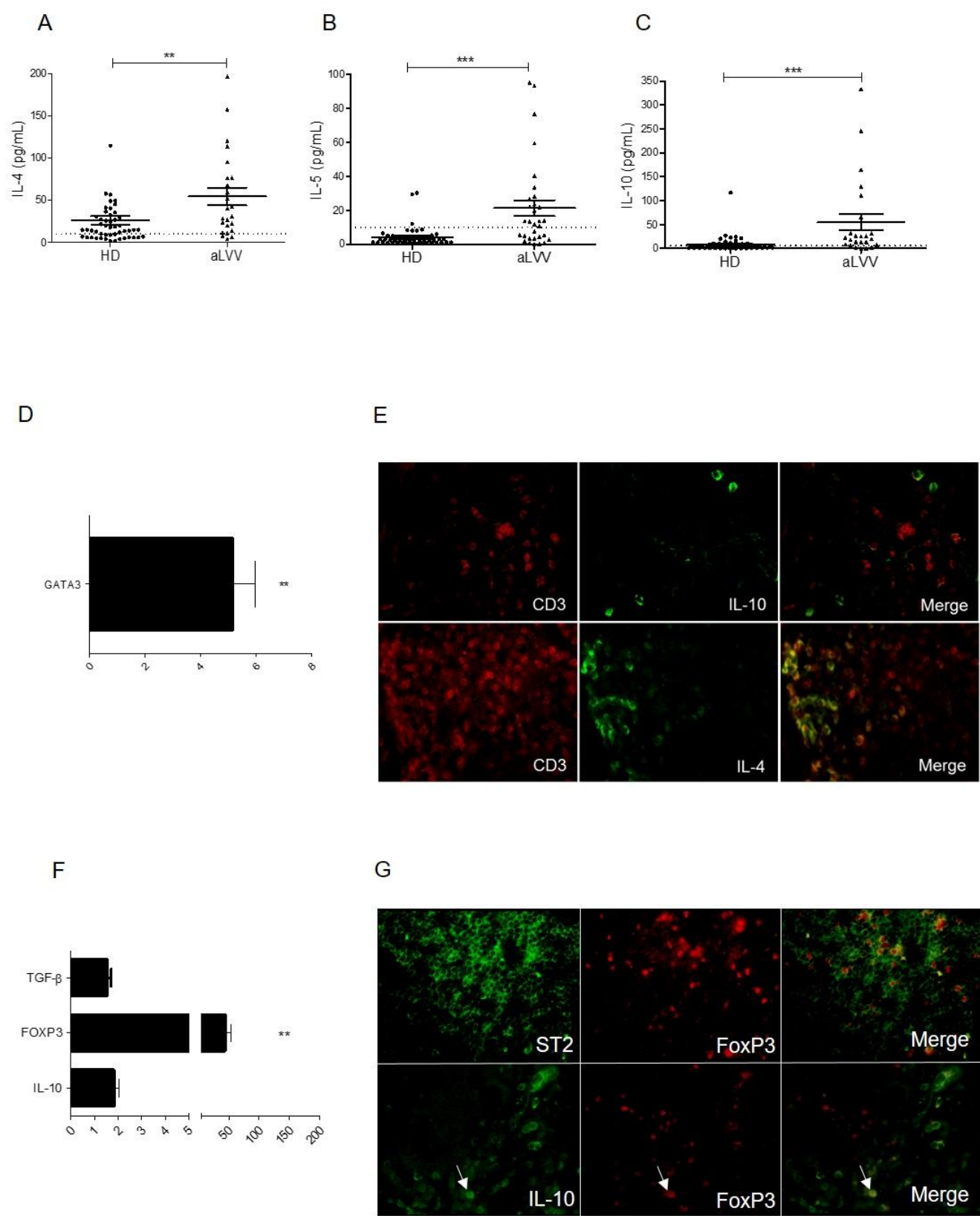


Figure 3

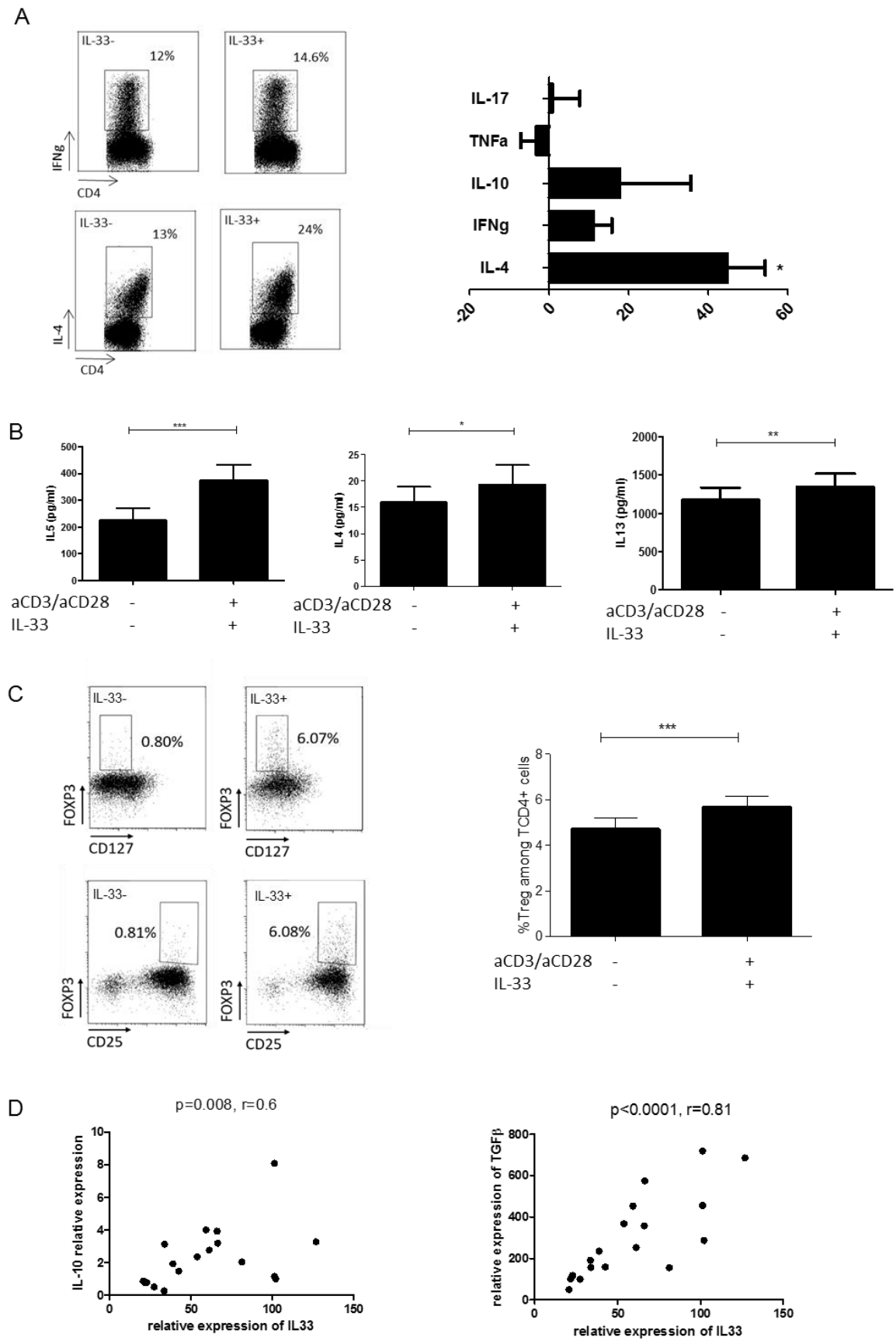
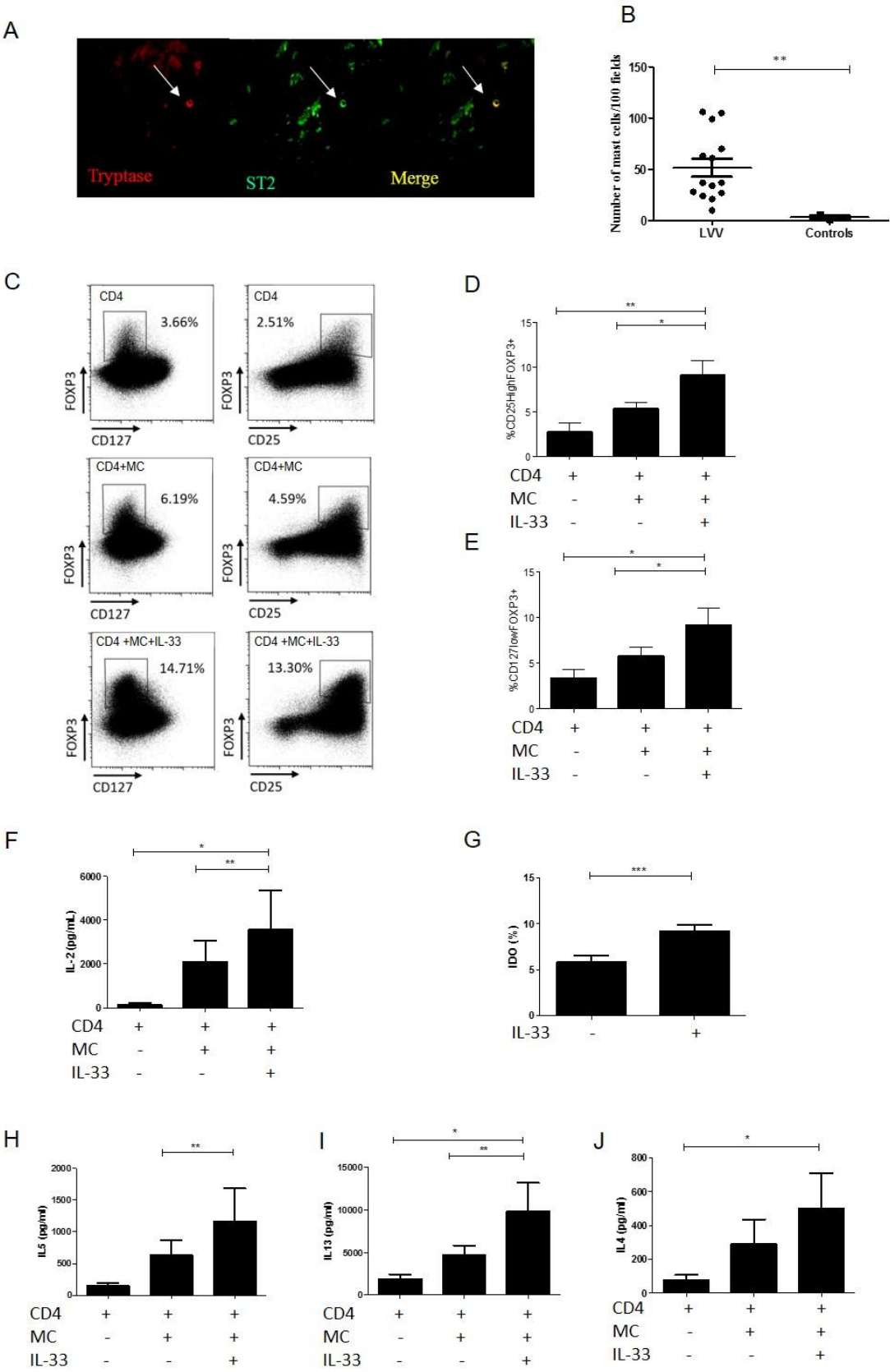


Figure 4



Critical impact of Interleukin-33 and mast cells in regulating angiogenesis, vascular permeability and tissue repair in large vessel vasculitis

AC Desbois^{1,2,3,4}, P Cacoub^{1,2,3,4}, AS Leroyer⁵, E Tellier⁵, M Garrido^{1,2,3}, A Maciejewski-Duval^{1,2,3}, C Comarmond^{1,2,3,4}, S Barete⁴, M Arock^{6,7}, P Bruneval⁸, JM Launay⁹, PJ Fouret¹⁰, U Blank¹¹, M Rosenzweig^{1,2,3,12}, D Klatzmann^{1,2,3,12}, M Jarraya¹³, P Cluzel¹⁴, F Koskas¹⁵, G Kaplanski^{5,16}, D Saadoun^{1,2,3,4}.

Running Title: IL-33 and mast cells and tissue remodeling in large vessel vasculitis

¹ Département Hospitalo-Universitaire Inflammation-Immunopathologie-Biothérapie (DHU i2B), F-75005, Paris, France.

² INSERM, UMR_S 959, F-75005, Paris, France.

³ Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, F-75005, Paris, France.

⁴ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Département de Médecine Interne et Immunologie Clinique, National center for rare Autoimmune and Systemic diseases and for Autoinflammatory diseases, F-75013, Paris, France.

⁵ Aix-Marseille Université, INSERM, Vascular Research Center of Marseille, UMR-S 1076, Marseille, France

⁶ Laboratoire de biotechnologies et pharmacologie génétique appliquée, CNRS UMR 8113, ENS - Ecole Normale Supérieure de Paris Saclay Cachan, France

⁷ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Laboratoire d'Hématologie Biologique, Paris, France

⁸AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Laboratoire d'anatomopathologie, Paris, France

⁹INSERM, UMR-S 942, F-75010, Paris, France.

¹⁰AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, laboratoire d'anatomopathologie, Paris, France

¹¹Inserm U1149, CNRS ERL8252, Faculté de Médecine Site X. Bichat, Paris, France

¹²AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Biotherapy (CIC-BTi)

¹³Banque des tissus Humains, Hôpital saint Louis, Paris, France

¹⁴AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'imagerie vasculaire, Paris, France

¹⁵AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Chirurgie vasculaire, Paris, France

¹⁶APHM, CHU Conception, Service de Médecine Interne, Marseille, France

Correspondence: David Saadoun, MD, PhD, Department of Internal Medicine and Laboratory I3 « Immunology, immunopathology, immunotherapy » UMR 7211 (CNRS/UPMC) INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.

Phone : + (33)(1) 42 17 80 88. Fax : + (33)(1) 42 17 80 33. E-Mail: david.saadoun@aphp.fr

Abstract

Background: Large vessel vasculitis (LVV) lesions results from chronic inflammation and neoangiogenesis. IL-33, a key cytokine involved in angiogenesis in physiological conditions has been previously found overexpressed in vascular inflammatory diseases.

Objectives: In the present study, we aimed at assessing the impact of IL-33 on angiogenesis, vascular permeability and tissue homeostasis in LVV.

Methods: In vitro studies on angiogenesis were conducted using human endothelial cells to assess migration, proliferation and angiogenesis. Vascular permeability was assessed in vivo, using Miles assay in wild-type and mast-cells deficient mice. Fibroblast differentiation and proliferation were assessed by flow cytometry and quantitative RT-PCR.

Results: Sera from TA patients were shown to have angiogenic properties. They promoted HUVECs proliferation, tube and sprout formation *in vitro* and were also able to induce vessel permeability *in vivo*. The addition of neutralising anti-IL-33 antibody inhibited neoangiogenesis, migration of endothelial cells *in vitro* and vascular permeability *in vivo*. Since mast cells are one of the main targets of IL-33, we repeated these experiments in mast-cells deficient mice in which *in vivo* effects were abolished. A significant increase in the number of mast cells was observed in TA aorta lesions as compared to non-inflammatory aorta controls. Regarding their effects on tissue repair, we found that the relative expressions of fibronectin, type 1 collagen and α SMA mRNA were significantly increased in fibroblasts cultured with supernatants of MC incubated with LVV serum (n=9), as compared to MC incubated with HD serum (n=3) or not stimulated (n=3). IL-33 did not exhibit direct effects on differentiation and proliferation of arterial fibroblasts.

Conclusion: IL-33/ST2 axis and mast cells have a critical role in promoting angiogenesis, vascular permeability and regulating tissue repair.

Introduction

Large vessel vasculitis (LVV), including Takayasu arteritis (TA) and giant cell arteritis (GCA) are idiopathic systemic vasculitis of the large and medium-sized vessels that may lead to segmental stenosis, occlusion, dilatation and/or aneurysm formation in the aorta and/or its main branches¹⁵⁴. Coronary and/or pulmonary arteries may also be affected. Histologically, the vascular lesions may affect the 3 tunics but predominate in the media and adventitia in TA whereas GCA lesions are characterized by granulomatous inflammation affecting particularly the media and comprising epithelioid macrophages and giant cells. In the acute phase, activated T cells, natural killer cells, γ/δ cells, and macrophages have been found in vessels^{173–175}. We have recently provided evidence that LVV inflammation was driven by Th1 and Th17 cells in the peripheral blood and inflamed tissues¹⁵⁵. This inflammatory reaction is associated with hyperplasia of vasa vasorum and subsequently with a medio-adventitia sclerosis and intimal proliferation¹⁷⁶. The inflow of inflammatory cells in arterial inflamed walls is mainly due to their interaction with specific adhesion molecules expressed on the inflamed endothelium. Neovessels and adventitial vasa vasorum are the main sites where adhesion molecules for leukocytes are expressed, and therefore the main sites through which circulating leucocytes are recruited into the vascular wall. The mechanisms resulting in the formation of new vessels in TA are still unclear.

Interleukin (IL)-33, a member of the IL-1 cytokine family, binds to a heterodimeric receptor complex consisting of ST2 (IL-1RL1) and IL-1 receptor accessory protein. IL-33 is predominantly expressed by epithelial and endothelial cells³⁹. IL-33 enhances angiogenesis and vascular permeability through ST2 in non-inflammatory conditions⁴³. Unlike, the other IL-1 family members, IL-33 is mainly known to induce Th2 immune responses by binding to ST2, which is expressed on a variety of cells such as Th2 CD4⁺ T cells, mast cells and regulatory T

cells (Tregs)^{39,167}. IL-33 can reduce the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice on a high-fat diet¹⁷⁷. Furthermore, IL-33/ST2 complexes also have been shown to activate cardioprotective signaling pathways¹⁰⁵.

Whilst IL-33 and its receptor ST2 have previously been found overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis¹⁵³, its function in inflammatory vascular diseases has not been evaluated. Herein, we report the critical role of interactions between IL-33 and mast cells in promoting angiogenesis, vascular permeability and tissue repair in LVV.

Methods

Patients

The study population consisted of 54 adult TA patients (median [IQR] age at diagnosis: 32.4 [27.3; 53.2] years) and 52 GCA patients (median [IQR] age at diagnosis: 74.7 [66.3; 83.2] years), fulfilling the international criteria for TA and GCA, respectively^{157,158}. All TA patients were evaluated in accordance with National Institute of Health (NIH) criteria for disease activity¹⁵⁹. Clinical characteristics of LVV patients are indicated in **Table 1**. Blood samples from healthy donors (HD) were also obtained. The study was approved by our institutional ethics review board and was performed according to the Helsinki declaration. Patients gave informed consent.

Immunohistochemistry

Detection of IL-33⁺, ST2⁺, tryptase cells and VEGF was performed on fixed, paraffin-embedded samples (aorta) from 28 LVV patients, and 3 non-inflammatory aorta controls. After dewaxing in baths of xylene and ethanol, slides were submitted to antigen retrieval by heating in citrate buffer pH 6.0. Before incubation with primary antibodies, Fc receptor was blocked with normal goat serum 3.3%. Slides were incubated over night with mouse monoclonal anti-IL-33 (dilution 1/1000, Enzo Life Sciences), rabbit polyclonal anti-ST2 (dilution 1/100, Sigma-Aldrich), monoclonal mouse anti-tryptase (DAKO), rabbit monoclonal anti-VEGF (abcam) or with isotype control: polyclonal Rabbit IgG or monoclonal mouse IgG (Abcam). Slides were then incubated for 2 hours at room temperature with Cy3-conjugated goat anti-mouse (working dilution 1:1000, Jackson ImmunoResearch) and Alexa 488 donkey anti-rabbit (working dilution 1:1000, Life Technologies), mounted in Mowiol, and evaluated under fluorescence microscopy (Leica Microsystems). IL-33 expression was quantified by counting the proportion of vWF⁺ vessels positive for IL-33 in aorta of TA patients and non-inflammatory controls. Mast cells were also quantified by counting the number of tryptase positive cells in 100 fields.

Gene expression quantification at the mRNA level in aortic tissues

Quantification of mRNA expression was performed on paraffin-embedded samples from TA patients (n=11) and controls with non-inflammatory aorta aneurysms (n=4). IL-33, ST2, VEGF, TGF- β , PDGF α and PDGF β genes were analysed. The theoretical and practical aspects of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the ABI Prism 7900 Sequence Detection System (PerkinElmer Applied Biosystems, Foster City, CA) have been described in detail elsewhere (13). Briefly, total RNA was extracted using the High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche) and was reverse-transcribed before real-time PCR amplification. Quantitative values were obtained from the threshold cycle (Ct) number at which the increase in the signal associated with exponential growth of PCR products began to be detected using analysis software, according to the recommendations of the manufacturer (PerkinElmer Applied Biosystems). The precise amount of total RNA added to each reaction mixture (based on optical density) and its quality (i.e., lack of extensive degradation) were both difficult to assess. We therefore also quantified transcripts of the *RPLP0* gene, which encodes the ribosomal protein subunit P0, as the endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its *RPLP0* content. Results, expressed as fold differences in target gene expression relative to the *RPLP0* gene (termed *Ntarget*), were determined using the formula $N_{target} = 2^{\Delta C_t} sample$. The ΔC_t value of the sample was determined by subtracting the Ct value of the target gene from the Ct value of the *RPLP0* gene. The *Ntarget* values of the samples were subsequently normalized to obtain a 'basal mRNA level' (smallest amount of mRNA quantifiable (Ct = 35)) equal to 1. Primers for *RPLP0* and the target genes were chosen

using Oligo, version 6.0 (National Biosciences, Plymouth, MN). To avoid amplification of contaminating genomic DNA, 1 of the 2 primers was placed at the junction between 2 exons. The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 50 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute.

***In vivo* permeability assays**

All animal experiments were performed in compliance with the guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by the Local Ethics Committee (approval 13-14122011). *In vivo* permeability was assessed using a modified Miles assay {Schepke, 2008 #8253}. Briefly, Evans blue dye (Sigma-Aldrich) was retro-orbitally injected into NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu immunodeficient male mice at 8 weeks of age (100 µl of 1% Evans blue in 0.9% NaCl). After 10 minutes, 40 µl of serum was injected intradermally. Twenty minutes later, the shaved dorsal skin at the injection area was excised using a calibrator ring, dye was extracted with formamide overnight at 55°C, and the dye absorbance was measured at 630 nm. For IL-33 inhibition experiments, 5 µg/ml neutralizing anti-human IL-33 antibody (R&D systems, AF3625) or of its corresponding isotype antibody control (R&D systems, AB-108C) was incubated with serum for one hour before the injection.

Western-blot assays

Sub-confluent HUVECs were starved for 12 hours, further stimulated with TA or HD serum, diluted 1/10, for 30 minutes, and then lysed in RIPA buffer containing protease/phosphatase inhibitors. Equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and then immunoblotted using anti-VEGFR-2 (Cell Signaling Technology), anti-phospho-VEGFR-2 (Y-1054) (Cell Signaling Technology), anti-Ve-Cadherin (abcam), anti-phospho-Ve-Cadherin (Y-658) (Merck Millipore) and anti-actin antibodies (Cell Signaling Technology).

***In vitro* endothelial cell migration assay**

The endothelial cell migration of HUVECs was assayed by chemotaxis assay through Transwell chambers (Corning Costar, 8 µm pore size) as previously described {Choi, 2009 #4449}. In brief, fresh EBM2 medium (Lonza) containing serum from patients to be tested (diluted 1/10) was placed in the lower wells. HUVECs (at passage 3) were trypsinised, suspended at a final concentration of 10⁶ cells/mL and loaded into each of the upper wells, and the chamber was incubated at 37°C for 4 hours. The cells were fixed and stained with hematoxylin and eosin. Nonmigrating cells on the upper surface of the filter were removed with a cotton swab, and chemotaxis was quantified with an optical microscope by counting cells that had migrated to the lower side of the filter. For IL-33 inhibition experiments, 5 µg/ml neutralizing anti-human IL-33 antibody (R&D systems, AF3625) or of its corresponding isotype antibody control (R&D systems, AB-108C) was incubated with serum.

***In vitro* endothelial activation**

Subconfluent HUVECs were incubated for 24h with TA or controls serum (5%) with IL-33 (10 ng/ml) or without IL-33. The expression of CD31 (Life Technologies), ICAM-1 (R&D Systems, Lille, France) was determined by flow cytometry.

***In vitro* angiogenesis assay**

Proliferation

Subconfluent HUVECs were starved for 12 h and were then incubated for 24h with TA serum (1/10) preincubated for 1h with neutralizing anti-IL33 or isotype antibodies (5 µg/ml). Proliferation was assayed by 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) incorporation using the Cell proliferation assay Kit (Roche Diagnostic).

Tube formation

Subconfluent HUVECs were starved for 12 h. Ninety-six-well plates were coated with 50 µL of growth factor reduced Matrigel (BD Biosciences) for 30 min at 37°C. HUVECs (20 000 cells/well) were deposited on Matrigel for 12h in presence of TA serum (1/10) preincubated for 1h with neutralizing anti-IL33 or isotype antibodies (5 µg/ml). Capillary-like structures and branch points were counted using ImageJ Version 1.44 software (NCBI). Each experiment was run in triplicate.

Spheroid formation

Spheroids were generated as described by Ligi et al¹⁷⁸. In short, HUVECs were suspended in culture medium containing 0.2% (weight/volume) carboxymethylcellulose. Spheroids were generated overnight and then embedded into collagen gels. After 24 hours in presence of TA or HD serum (1/10) preincubated for 1h with neutralizing anti-IL33 or isotype antibodies (5 µg/ml), 20 randomly selected spheroids were analysed (at ×20 magnifications) using a Leica microscope. The number and total length of sprout per spheroid were evaluated.

Culture of mast cells

Human ROSA^{KIT^{WT}}¹⁷ mast cells were cultured with serum (10%) of HD (n=3) or LVV patients (n=11) in the presence or the absence of recombinant IL-33 (10ng/ml). Levels of histamine and tryptase were measured in culture supernatants after 1 hour.

***In vitro* proliferation and differentiation of fibroblast**

Arterial fibroblasts were isolated from the adventitia of non-inflammatory arteries. Briefly, the adventitial layer was separated from the media layer and then digested with collagenase solution for 3 hours at 37°C. Filtered cells were washed and then cultured. Before performing experiments, fibroblasts were cultured for 24 hours in medium without serum and subsequently stained with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Fibroblasts (20000/well) were thereafter incubated for 4 and 7 days with LVV or HD serum (10%) with isotype or neutralizing anti-IL-33 antibody (0.5µg/ml). To assess the impact of mast cells on the differentiation of fibroblasts, arterial fibroblasts were also incubated for 4 and 7 days with supernatants (10%) of mast cells previously cultured with LVV or HD serum for 24 hours. The expression of αSMA (R&D Systems, Lille, France) was determined by flow cytometry. Proliferation was determined by CFSE staining by flow cytometry. Production of collagen (COL1A), fibronectin, αSMA, TGF-β and PDGF-α was assessed by quantitative PCR. Briefly, total RNA was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen) and reverse-transcribed using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) both according to the manufacturer's instruction. Gene expression was determined by real-time PCR. Each cDNA sample was amplified in triplicate using SYBR Green (Applied Biosystems) on 7500 FAST Real-time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute. Quantitative values were obtained from the threshold cycle (Ct) number at which the

increase in the signal associated with exponential growth of PCR products began to be detected. *GADPH* gene was used as an endogenous control. The primers were designed to span introns and are listed in supplementary Table.

Statistics

Continuous variables were presented with the median and extreme values or with the mean $\pm$ SEM. Categorical variables were presented with counts and proportions. Statistical comparisons were performed by using the Mann-Whitney test for quantitative unpaired data, and the Wilcoxon matched pairs test for quantitative paired data. All statistical tests were two-tailed with a significance level of 0.05. Statistical significance was evaluated using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Takayasu serum supports migration of endothelial cells and neo-angiogenesis through IL-33

We have previously shown significant increased levels of IL-33 in both the serum and inflammatory arterial lesions of LVV patients as compared to healthy donors (HD). We next investigated whether LVV serum could have a direct functional activity on endothelial cells by exploring its role on endothelial cell migration. We performed chemotaxis assays of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) in response to either LVV serum or HD serum. The effects of rheumatoid arthritis (RA) serum on endothelial cell migration were also evaluated as controls of arteritis diseases. Serum obtained from LVV patients significantly increased the migration of HUVECs, evaluated by the number of transmigrated cells per field, in comparison with serum obtained from HD group (**Figure 1A**). Because IL-33 is abundant in LVV serum and since it has been involved in endothelial cell migration⁴³, chemotaxis assays were repeated in the presence of neutralizing anti-IL33 antibody or its corresponding isotype antibody as a control. Exposure of serum to anti-IL-33 significantly decreased by 68% the number of transmigrated cells per field (**Figure 1B**). Altogether, these results suggest that LVV serum has an angiogenic activity mediated, at least in part, by IL-33.

We also examined the effect of IL-33 neutralisation on the angiogenic capacity of endothelial cells incubated with LVV serum. The neutralising anti-IL33 antibodies induced a modest but significant decrease of the mitotic potential of HUVECs as shown by BrdU incorporation assay (**Figure 1C**). Moreover, in Matrigel assays, the addition of anti-IL33 antibodies decreased significantly the endothelial network formation by HUVECs, as shown by a decreased number of closed tubes and branches (**Figures 1D, E and F**). Moreover, in a three-dimensional spheroid assay, sprouts formation and length measure were reduced by the preincubation of

LVV serum with anti-IL33 antibodies. These results reveal a significant effect of IL-33 inhibition on *in vitro* angiogenic properties of HUVECs incubated with LVV serum (**Figures 1G, H and I**).

Increased vascular permeability in TA is partially dependent on IL-33

We next examined the effects of TA serum on the vascular permeability by performing a Miles assay in response to the injection of sera obtained from inflammatory diseases or controls. Sera obtained from TA and GCA patients were able to induce vessel permeability as efficiently as histamine, which is known to be a strong inductor of vascular permeability, whereas sera obtained from HD did not have a similar effect (**Figure 2A**). Similarly, sera obtained from RA significantly increased the extravasation of Blue Evans, compared to HD serum. However, the addition of neutralising anti-IL-33 antibody to TA serum one hour before its injection inhibited partially the increased vascular permeability as compared to the addition of the isotype antibody (**Figures 2A**).

We further explored the cellular mechanisms of permeability induced by TA serum. Since VEGFR-2 and Ve-Cadherin activation are essential mediators of vascular permeability, we next analysed VEGFR-2 and Ve-Cadherin phosphorylations in HUVECs exposed to TA or HD serum for 30 minutes. The exposure of TA sera to HUVECs led to an increase of VEGFR-2 phosphorylation and a significant increase of VeCad phosphorylation compared to controls sera ($p=0.03$) (**Figures 2B, C and D**). Consistently, the quantitative analysis of mRNA within inflammatory lesions of LVV aorta revealed an overexpression of VEGF (3.2 ± 0.5) as compared to controls with non-inflammatory aorta aneurysms. We next assessed the *in vivo* expression of IL-33 mRNA and VEGF mRNAs within inflammatory aortic lesions of GCA

patients (n=18). The relative expression of IL-33 mRNA was found to be significantly correlated with that of VEGF [$r=0.51$, $p=0.02$]. (**Figure 2E**)

As VEGF is also a strong endothelial activator and is increased in TA, we consequently studied endothelial activation in this disease. Consistently, sera obtained from LVV patients (n=13) led to an increase of ICAM-1 expression on endothelial cells as compared to those (n=5) obtained from HD [32.5 (+/-16.8)% in LVV vs 24.6 (+/-4.7)% in HD]. The addition of recombinant human IL-33 was associated with higher median level of ICAM-1 expression on HUVECs [31.8 (+/-18.9)% without IL-33 and 80.2 (+/-14.9)%, $p=0.004$]. IL-33 blocking was associated with discrete but significant decrease of ICAM-1 expression on HUVECS (**Figures 2 F-G**). These data showed that LVV enhance vascular permeability and endothelial activation and that this effect is partially dependent on IL-33.

IL-33 induced vessel permeability is mediated by mast cells

As mast cells represent one of the main targets of IL-33, we repeated a Miles assay in mast cell-deficient mice. First, we have shown by immunofluorescence an increased number of mast cells in LVV lesions within the aorta as compared to non-inflammatory controls ($p=0.02$) (**Figures 3A**). Some mast cells showed positive staining for IL-33 receptor (ST2) and VEGF (**Figure 3A**). We next attempted to determine if IL-33 increased vascular permeability depended on mast cells. We confirmed that the addition of neutralizing anti-IL-33 antibody on LVV sera prevented the increase in vascular permeability ($p=0.004$) in WT mice (NMRI-Foxn1nu/Foxn1nu immunodeficient male mice) as previously shown. Interestingly, vascular permeability was significantly decreased in mast cell-deficient mice injected with the same LVV sera compared to WT mice ($p=0.0001$). The addition of neutralising anti-IL-33 antibody

had no impact on vascular permeability in mast cell-deficient mice (**Figure 3B**). Altogether, this data strongly suggested that the increased vascular permeability induced by IL-33 in LVV was dependent on mast cells. We next determined mechanisms that were responsible of increased vascular permeability by MC and IL-33. Measurements of tryptase and histamine were performed in culture supernatants of MC stimulated or not with IL-33. Levels of tryptase and histamine were significantly higher in MC stimulated with IL-33 ($p=0.006$ and 0.001 , respectively). (**Figures 3C and D**)

Effects of MC and IL-33 on fibroblast functions

First, we have shown that the degranulation of mast cells induced by LVV serum is more important than that induced by HD serum since histamine levels are higher in supernatants of mast cells incubated with LVV serum as compared to HD serum ($p=0.01$) (**Figure 4A**). To assess the role of MC, we performed cultures of arterial fibroblast for 5 days with supernatant of MC cultures ($n=5$) stimulated or not by IL-33. The addition of MC supernatant was associated with a significant increase in α SMA expression by flow cytometry as compared to fibroblasts incubated with serum of the same patients (**Figure 4B**). Consistently, the relative expressions of fibronectin, type 1 collagen and α SMA mRNA were significantly increased in fibroblasts incubated with supernatants of MC cultured with LVV serum ($n=9$), as compared to MC incubated with HD serum ($n=3$) and fibroblast directly incubated with LVV serum ($n=11$) or not stimulated ($n=3$) (**Figures 4C**).

We next attempted to determine if IL-33 was directly associated with impaired phenotype of fibroblasts. We performed culture of arterial fibroblast incubated with the serum of LVV patients ($n=9$) or HD ($n=3$) in the presence of neutralising anti-IL-33 antibody or isotype. We found that fibroblast proliferation was increased for fibroblasts incubated with LVV sera as compared to HD sera. However, IL-33 blocking was not associated with changes in fibroblast

proliferation. We also assessed the production of fibrosing factors by qPCR. Preliminary results showed that IL-33 blocking tended to be associated with an increase in the relative expression of PDGF- α , α SMA, fibronectin and COL1A mRNA although these differences were not significant. Moreover, the proliferation of fibroblasts was similar in the presence of MC supernatant stimulated by IL-33 as compared to those not stimulated (**Figure 4D**). Similarly, the expression of α SMA did not differ in either condition (**Figure 4E**).

However, IL-33 may indirectly lead to fibrosis by inducing immunomodulatory effects. As we have previously shown, IL-33 leads to Th2 immune response, by increasing IL-5, IL-3 and IL-13 production. Aortic expression of IL-13 mRNA was significantly correlated with fibrosis in the intima and in the media ($p=0.04$ and $p=0.01$, respectively) (**Data not shown**). Moreover, the relative expression of IL-33 mRNA in LVV aorta was found to be significantly correlated with those of PDGF- α [$r=0.7$, $p=0.001$] and PDGF- β [$r=0.65$, $p=0.003$]. IL-33 stimulation led to an increase in the secretion of PDGF- α by purified CD14⁺ cells of LVV patients ($p<0.05$).

Discussion

LVV mainly include TA, which is a model of human large vessel vasculitis involving young adults and of unknown pathogenesis, and GCA involving people over 50 years old. Inflammation and angiogenesis are closely associated and pathologic angiogenesis has been implicated in the development of LVV^{176,179}. In LVV, inflammation induced neovessels and adventitial vasa vasorum. Neovascularization is also a reparative mechanism and a natural response to ischemia. Interplay between inflammation and angiogenesis is mediated largely by cytokines, chemokines and growth factors. Some of these molecules induce endothelial activation and vascular permeability, allowing the infiltration of leukocytes to inflammatory sites and resulting in tissue damage. Here we have shown that IL-33/ST2 axis through its interaction with mast cell plays a critical angiogenic role in the pathogenesis of LVV. We have previously identified increased IL-33 levels in serum and in inflammatory aorta of TA patients relative to HD. Intravascular IL-33 staining filled the vessel lumen and colocalised with endothelial cells in the aorta of TA patients. Consistently, Ciccia *et al* have previously found overexpression of IL-33 in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis¹⁵³. IL-33 was initially described as being abundantly expressed in high endothelial venules, specialised blood vessels mediating lymphocyte recruitment into lymph node¹⁶². IL-33 is constitutively expressed by endothelial and epithelial cells and released by these cells following necrotic cell death¹⁶³. IL-33 was found in vascular endothelium¹⁷⁷, coronary artery endothelium¹⁶⁵ and vascular smooth muscle cells¹⁵³ and was shown to induce the production of cytokines from human mast cells and T cells¹⁸⁰.

In vitro, in non-inflammatory ischemic condition, IL-33 is an activator of endothelial cells, which promotes the expression of adhesion molecules on endothelial cells, angiogenesis and

vascular permeability^{43,44}. We provide evidence that IL-33 is critical in modulating vessel permeability and angiogenesis also in inflammatory vascular disease. We performed chemotaxis assays of HUVECs in response to TA, GCA, RA (disease controls) or HD sera. Sera from LVV patients significantly increased the migration of endothelial cells. Consistently, the quantitative analysis of mRNA within inflammatory lesions of LVV aorta has revealed an overexpression of VEGF. In addition, sera from LVV patients showed angiogenic properties by promoting HUVECs proliferation, tube and sprout formation and were also able to induce *in vivo* vessel permeability as compared to RA or healthy controls. Sera from TA patients also induced the phosphorylation of VeCad, an essential mediator of vascular permeability. The neutralisation of IL-33 with anti-IL-33Ab significantly reduced migration of endothelial cells, angiogenesis (proliferation, tube and spheroids formation), endothelial activation (ICAM-1 expression) and *in vivo* vascular permeability. Altogether, these results suggest that sera from LVV patients have an angiogenic activity mediated, at least in part, by IL-33. Consistently, we have shown positive correlations between the relative expression of IL-33 mRNA and pro-angiogenic factors such as PDGF- α , PDGF- β and VEGF within inflammatory aortic lesions. Ciccia *et al* reported the positive correlation between IL-33 and the number of neovessels in giant cell arteritis, also suggesting a role of IL-33 in angiogenesis-dependent inflammation of LVV¹⁵³. Treatment of endothelial cells with IL-33 has been shown to promote vascular remodeling and maintenance of vascular integrity¹⁸¹.

We next attempted to determine by which targets IL-33 increased vascular permeability. ST2 was expressed in LVV patients on mast cells. Although mast cells are present in most tissues, we observed a significantly higher proportion of these cells in LVV in comparison with non-inflammatory aorta controls. Since mast cells represent one of the main targets of IL-33, we repeated a Miles assay in mice deficient in mast cells and demonstrated that vessel permeability induced by LVV serum was partially mediated by mast cells. Together, the IL-

33/ST2 axis and mast cells constitute one important link between cell injury inflammatory response, angiogenesis vascular permeability and endothelial activation that may be deleterious by promoting persistent inflammation, but could also be beneficial by leading to the restoration of tissue homeostasis.

In LVV, inflammatory response is followed by hyperplasia of vasa vasorum and subsequently by medio-adventitia sclerosis and intimal proliferation. Since IL-33 is associated with Th2 response and promotes angiogenesis, we attempted to determine its effects on arterial fibrosis. In other cardiovascular disease models, IL-33 induction following vascular and cardiac stress was correlated with improved outcomes^{105,177,182}. IL-33 reduced atherosclerosis¹⁷⁷ improved cardiac function, decreased fibrosis after myocardial infarction¹⁸² and limited pressure overload induced cardiac hypertrophy and fibrosis¹⁰⁵. However, in other conditions, IL-33 may also promote tissue repair, occasionally resulting in pathologic fibrotic reactions. Elevated serum IL-33 was observed in autoimmune disease such as systemic sclerosis and rheumatoid arthritis^{183,184}. IL-33 correlated with the extent of skin and lung fibrosis in human patients with systemic sclerosis¹⁸⁴. In mouse models of liver fibrosis, IL-33 promoted hepatic stellate cell activation and liver fibrosis through ILC2 derived IL-13¹⁸⁵. In the present study, we have shown that MC activated by LVV serum enhanced differentiation of fibroblasts and the secretion of fibrosing factors such as fibronectin or collagen. However, MC stimulated with IL-33 had similar effects than those not stimulated. Consistently, our data did not highlight a direct fibrosing impact of IL-33 on arterial fibroblasts. Still, IL-33 may promote tissue repair and fibrosis through its immunomodulatory effects. Indeed, we have previously shown that IL-33 induced a regulatory response and led to increased secretion of IL-5 and IL-13, which are associated with fibrosis. Consistently, ILC2 stimulated with IL-33 and ST2+ Treg were shown to be critical in enhancing tissue repair^{100–102}. We have also found positive

correlations between aortic expression of IL-33 mRNA and those of PDGF- β , PDGF- α and TGF- β , known to be associated with tissue repair. IL-33 also led to increased secretion of PDGF- α by monocytes of LVV patients. Altogether, these data suggest that MC enhance the differentiation of fibroblasts whereas IL-33 may indirectly promote tissue repair as well as arterial fibrosis during persistent and uncontrolled inflammation.

In summary, our findings suggest that IL-33/ST2 axis holds a key role in LVV. Through its action on endothelial cells and mast cells, it may induce endothelial activation, vascular permeability and neo-angiogenesis which are key features of LVV. Activated mast cells are associated with impaired fibroblast phenotype whereas IL-33 may promote tissue repair through its immunological effects. Together, this data indicates the critical impact of IL-33/ST2 axis and mast cells in regulating angiogenesis, endothelial activation and tissue repair during vascular inflammation.

Author contributions:

Study concept and design: ACD, PC, ASL, GK, DSA

Conducting experiments: ACD, ASL, ET, MG, AMD

Analysis and interpretation of data: ACD, PC, ASL, ET, GK, DSA

Writing of the manuscript: ACD, PC, ASL, GK, DSA

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: ACD, PC, ASL, ET, AMD, SB, MA, PB, JML, PF, UB, MR, DK, MJ, PC, FK, GK, DSA

Acknowledgments

We thank all patients and all physicians involved in the care of the patients. We also thank Fabien Pitoiset, Gaith Wedeh, Sophie Vacher, Ivan Bièche, Thomas Vazquez, Guillaume Churlaud, Michele Barbié, Nathalie Ferry, Cornelia Degbe, Sylvain Porrot, and Valentin Quiniou for their input in conducting experiments.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Funding: Fondation pour la Recherche médicale

Figure 1: IL-33 supports migration of endothelial cells and neo-angiogenesis in LVV

A. Chemotaxis motility of HUVECs was assessed in response to sera obtained from TA patients (n=6), RA patients (n=8), HD (n=4) incubated in the lower chambers of Transwell during 4 hours at 37°C. Endothelial cell migration was evaluated by counting the number of transmigrated cells with an optical microscope. TA sera significantly induced endothelial cell migration.

B. Chemotaxis activity of TA sera (n=5) was analysed in the presence of anti-IL33 neutralizing antibody or isotype antibodies. The addition of anti-IL33 significantly decreased the number of transmigrated cells per field.

C. Percentage of proliferation rate by BrDU incorporation assay of HUVECs treated for 24h with TA (n=12) serum (1/10) preincubated for 1h with neutralizing anti-IL33 or isotype antibodies condition corresponding to the 100 %.

D. *In vitro* angiogenesis assay on growth factor reduced Matrigel. Representative experiment of capillary tube formation by HUVECs treated for 12h with TA sera (1/10) preincubated for 1h with neutralizing anti-IL33 (pictures a-c) or the same TA sera preincubated for 1h with isotype antibodies (pictures d-f). Images are representative of all experiments performed with 8 TA sera and analyzed in triplicate.

E. F. Tube formation and branch points of pseudotubes were counted 12 hours later (original magnification $\times 4$).

G. Three-dimensional *in vitro* angiogenesis assay with collagen gel-embedded spheroids of HUVECs treated with TA serum (1/10) preincubated (pictures a-c) or not (pictures d-e) with anti-IL33 antibody (original magnification $\times 20$). Pictures are representative of all experiments performed with 6 TA sera analysed in triplicate.

H. I. Quantification of the number of sprouts and of the cumulative sprout length per spheroid. For each experiment, sprouts from 20 spheroids were counted.

Data are means $\pm$ SEM of independent samples in experiments performed in triplicate.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2: IL-33 promotes vascular permeability

A. Vessel permeability induced by sera obtained from TA (n=8), GCA (n=6), RA (n=8) diseases and HD (n=6) was evaluated by performing a Miles assay. Evans blue dye extravasation, as a measure of vascular leakiness, was analysed using spectrophotometry. For each group, neutralizing anti-IL33 or isotype antibodies were incubated with serum 1h before the injection and extravasation of the dye after injection was compared. Vessel permeability induced by sera from TA and GCA patients was significantly higher than control group and its effect was significantly decreased by the addition of neutralizing anti-IL33.

B. Subconfluent HUVECs were starved for 12 h and were then incubated with sera from TA (n=4) and HD (n=4) during 30 minutes. Phosphorylated VEGFR-2 at Y-1054, phosphorylated Ve-cadherin at Y-658 were detected by Western blotting.

C, D. Quantification of the VEGFR-2 and Ve-Cad activations were determined by measuring the band density ratios of phosphorylated proteins/total proteins.

E. Positive correlations between relative expression of IL-33 mRNA and VEGF within inflammatory aortic lesions (n=21).

F. Subconfluent HUVECs were incubated for 24h with TA or controls serum (5%) with IL-33 (right) or without (left) IL-33. The expression of CD31 and ICAM-1 was determined by flow cytometry.

G. Sera obtained from LVV patients (n=13) increased ICAM1 expression on endothelial cells as compared to those obtained from HD (n=5). The addition of IL-33 on HUVECS further increased ICAM-1 expression whereas IL-33 blocking was associated with mild decrease of ICAM-1 expression.

These data are shown as means $\pm$ SEM, **P<0.01. Statistical comparisons were performed by using the Mann-Whitney test for quantitative unpaired data, and the Wilcoxon matched pairs test for quantitative paired data.

Figure 3: The increase of vascular permeability induced by IL-33 is dependent on mast cells.

- A. Immunofluorescence staining of TA inflammatory lesions showed expression of ST2 and VEGF on mast cells. The number of mast cells within aorta was higher in TA patients (n=7) and GCA (n=7) than in non-inflammatory aorta controls (n=3). These data are shown as means $\pm$ SEM, * $P < 0.05$.
- B. Miles assay on WT and mast cells KO mice were performed as described in figure 3. Vascular permeability induced by injection of sera from LVV patients was significantly decreased in KO mice as compared to WT mice (n=20 in each group). The addition of IL-33 inhibitors had no impact on vascular permeability. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
- C. MC were incubated with serum of LVV patients (n=11) for 1 hour with or without IL-33. Levels of tryptase were measured in culture supernatants. ** $P < 0.01$. These data are shown as means $\pm$ SEM.
- D. Levels of histamine were measured in culture supernatants. *** $P < 0.001$. These data are shown as means $\pm$ SEM,

Figure 4: IL-33 impact on tissue repair and arterial fibrosis

- A. Histamine levels of mast cells incubated with LVV serum (n=11) and HD serum (n=3). These data are shown as means $\pm$ SEM, * P<0.05.
- B. Expression of α SMA on fibroblasts cultured with LVV serum (n=6) and supernatants of MC incubated with LVV serum (n=3). These data are shown as means $\pm$ SEM, * P<0.05.
- C. Production of fibronectin, α SMA and type 1 collagen by fibroblasts cultured with supernatants of MC incubated with LVV serum (n=9) or with HD serum (n=3) and fibroblast incubated with LVV serum (n=11) or not stimulated (n=3) was determined by qPCR. These data are shown as means $\pm$ SEM, * P<0.05. **P<0.01***P<0.001
- D. CFSE staining of fibroblasts incubated with supernatant of MC cultured with LVV serum and stimulated with IL-33 or not. Fibroblastic proliferation was similar in both conditions. This plot is representative of experiments performed with 5 patients.
- E. Expression of α SMA was similar in fibroblasts incubated with supernatants of MC stimulated with IL-33 or not (n=5 in each group).

Table 1: Main characteristics of LVV patients. Data are expressed as n (%) for qualitative values and as median [IQR] for quantitative values. IQR: Interquartile ranges [Q25; Q75]

Parameters	n=106
Demographic features	
TA patients	54 (50.9%)
GCA patients	52 (49.1%)
Median age [IQR]	TA:32.4 [27.2; 53.2] GCA: 74.7 [66.3; 83.2]
Female gender	78 (73.6%)
Geographic origin	
Caucasian	69 (65.1%)
African	15 (14.2%)
North African	17 (16%)
Other	5 (4.7%)
Clinical features	
Numano Classification (TA patients)	
I	7 (14.3%)
II	8 (16.3%)
III	5 (10.2%)
IV	1 (2%)
V	27 (55%)
Ischemic cardiac disease	6 (5.7%)
Ocular complications	5 (4.7%)
Stroke	19 (17.9%)
Aortic aneurysms	22 (20.8%)

Figure 1

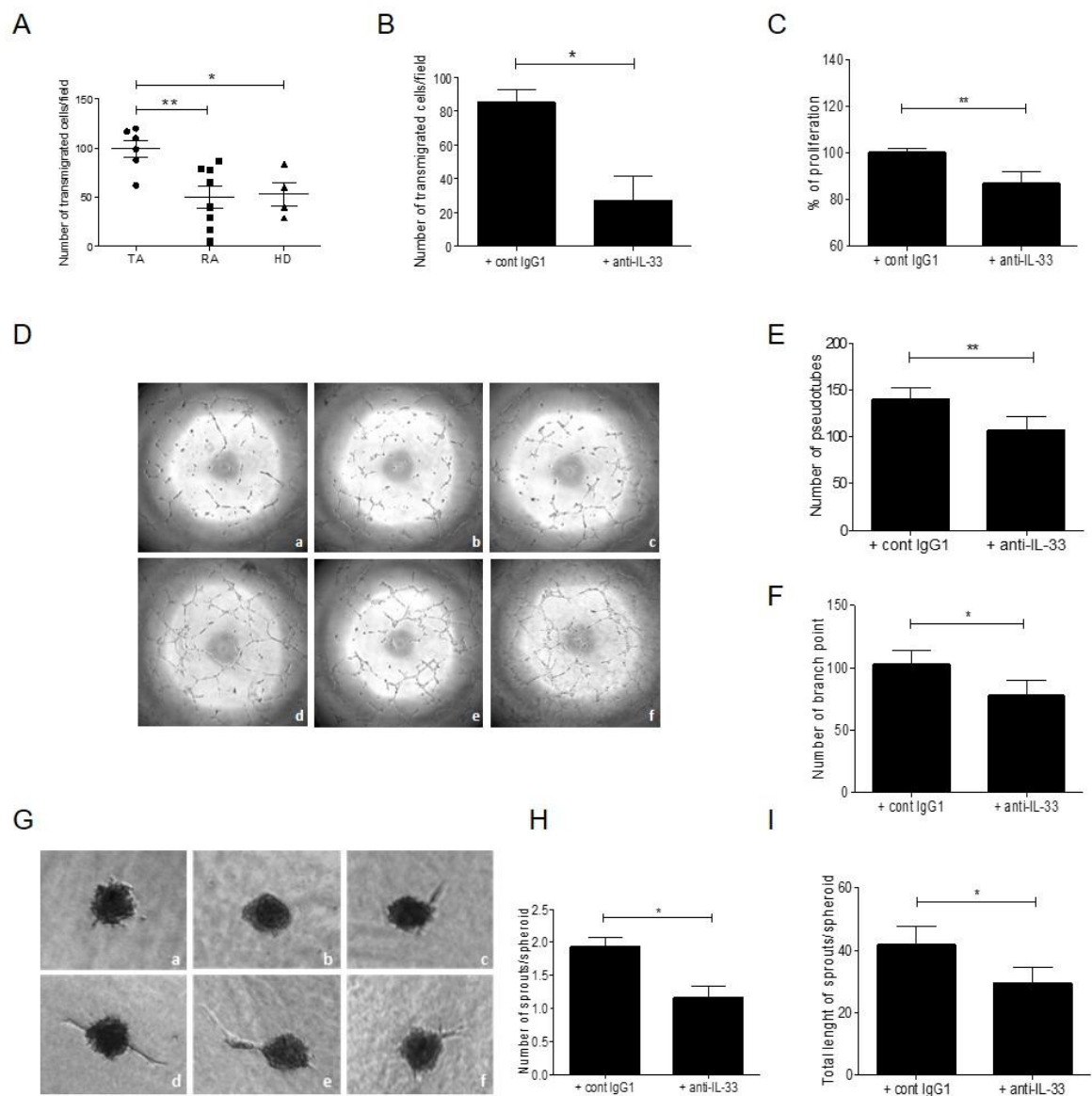


Figure 2

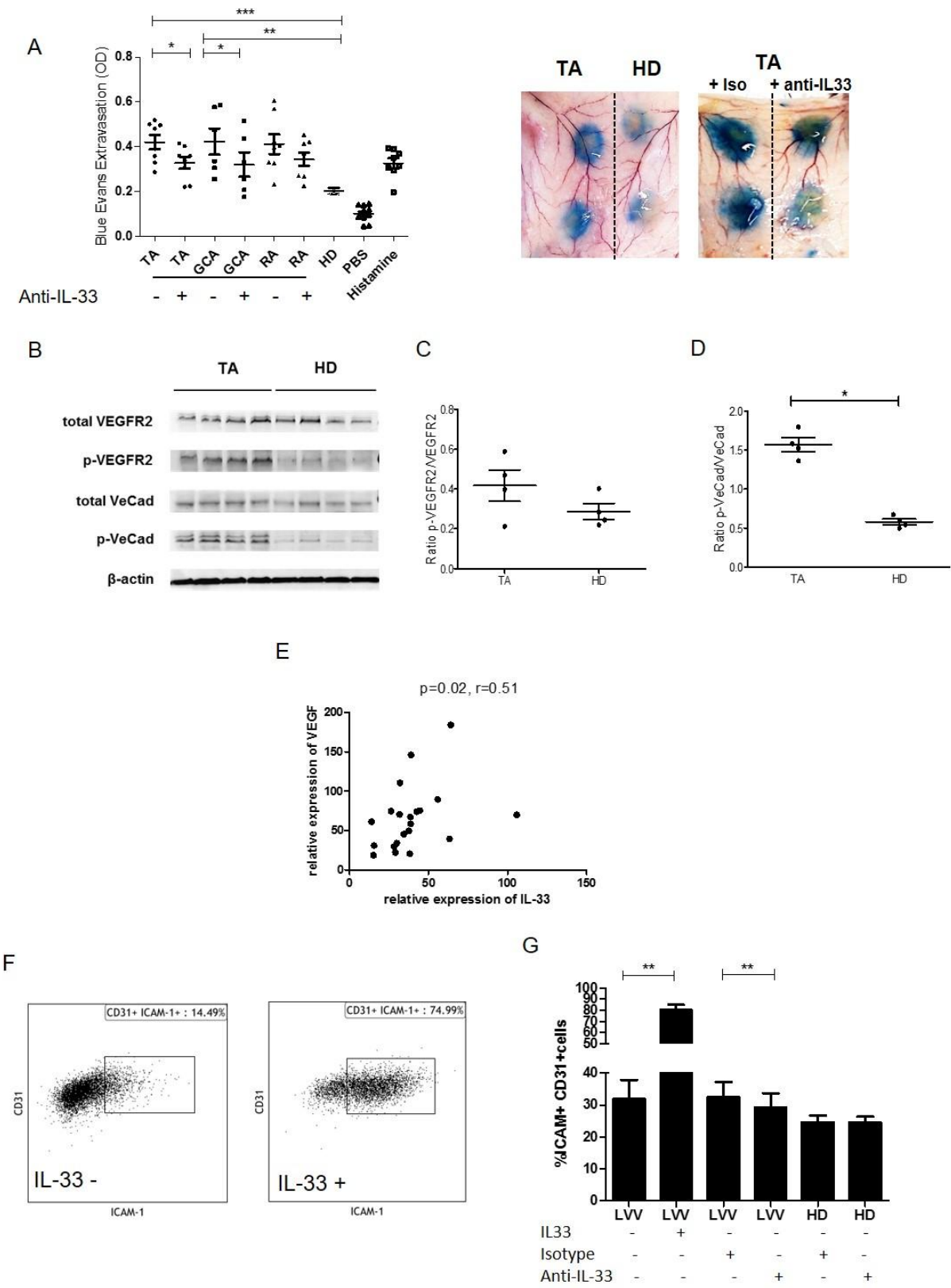


Figure 3

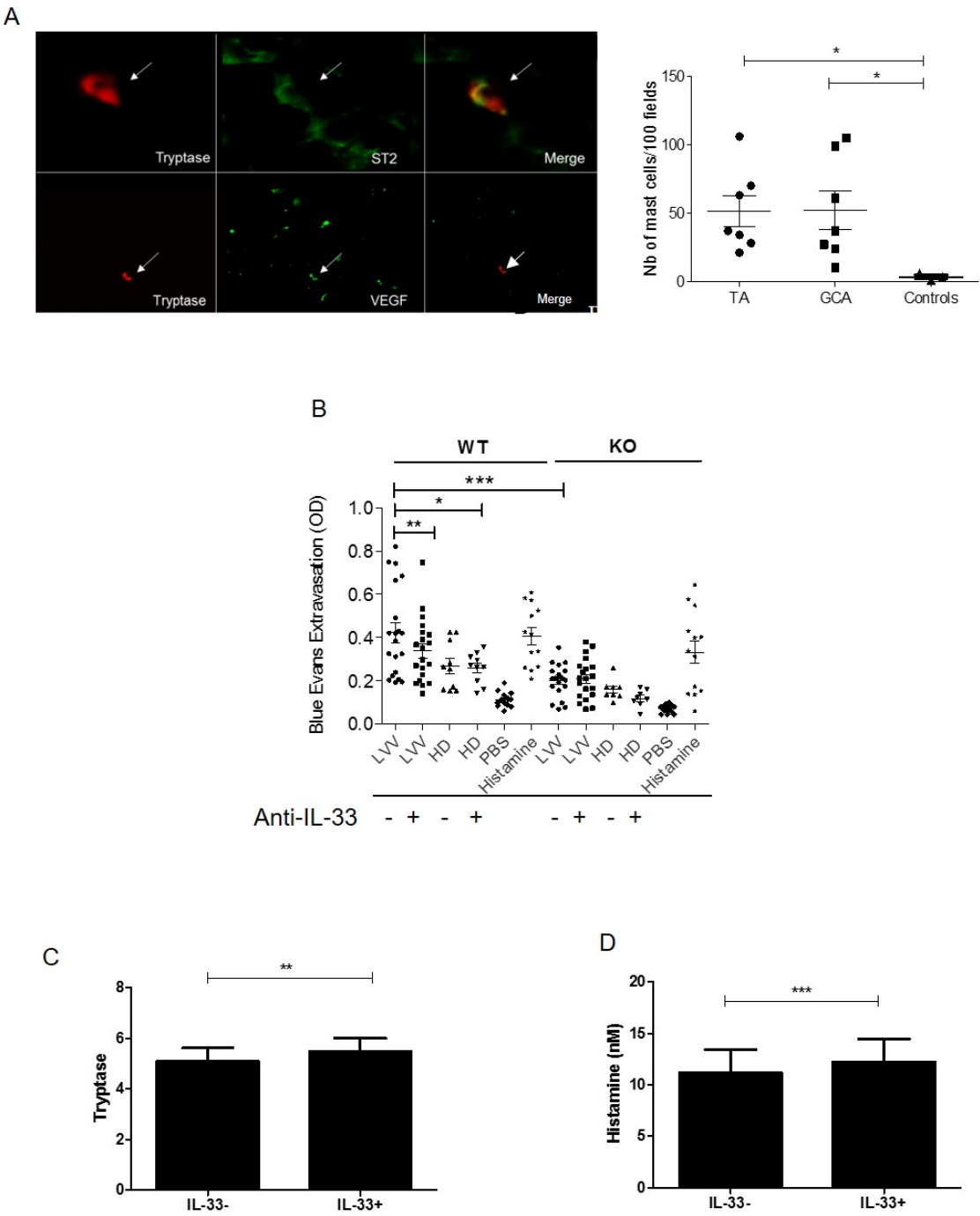
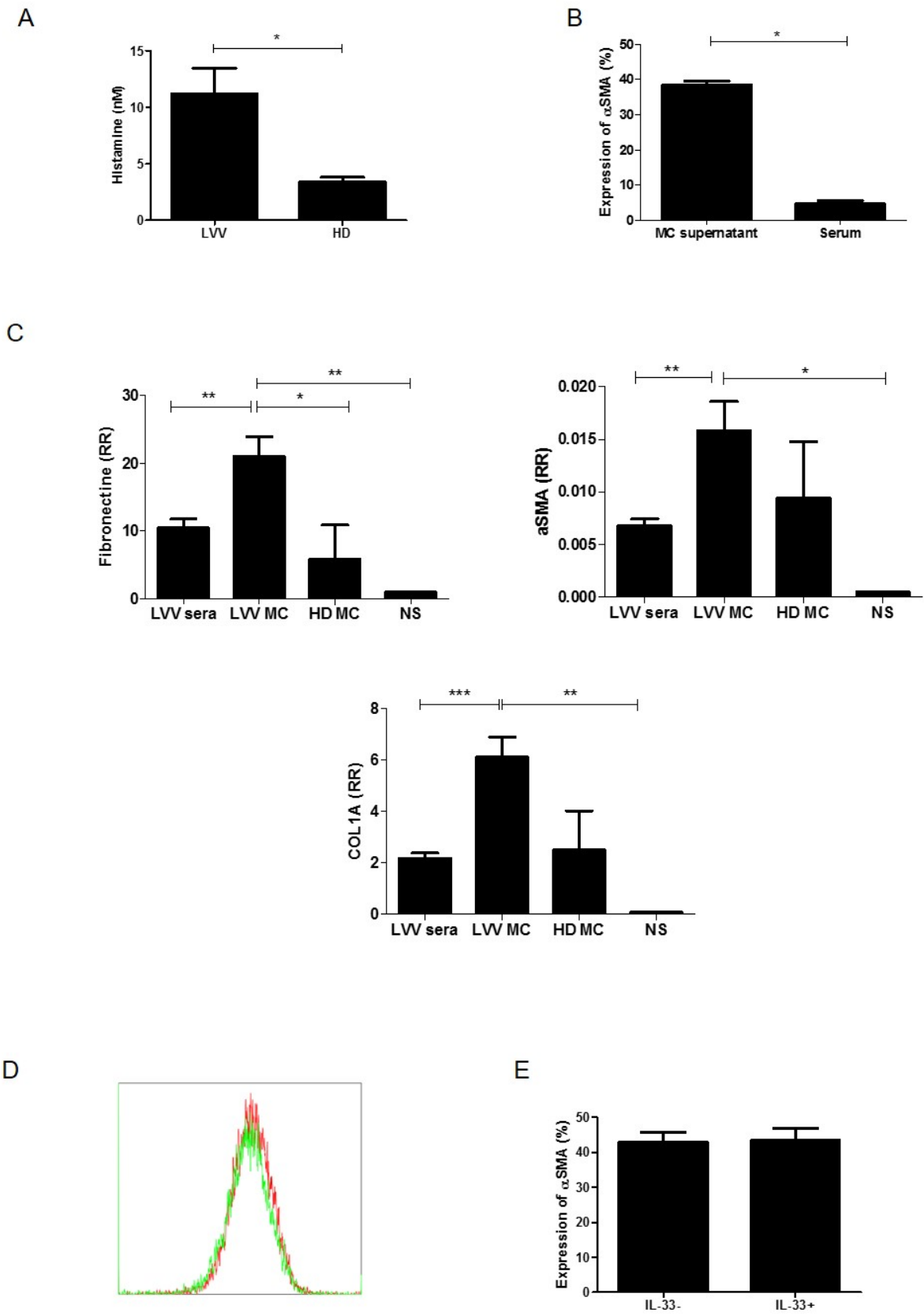


Figure 4



Coordinated T follicular helper cells and B cells in tertiary lymphoid structures in Takayasu arteritis.

AC. Desbois^{1,2,3}, C. Comarmond^{1,2,3}, V. Quiniou^{1,2}, H. Vallet^{1,2}, A. Maciejewski-Duval^{1,2}, P. Bruneval⁴, N. Derian^{1,2}, J Pouchot⁵, T. Manoliu⁶, B Bienvenu⁷, P. Fouret⁸, F. Koskas⁹, M Garrido^{1,2}, M. Rosenzweig^{1,2}, D. Klatzmann^{1,2}, P. Cacoub^{1,2,3} and D. Saadoun^{1,2,3}

¹ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR S 959, Immunology-Immunopathology- Immunotherapy (I3); F-75005, Paris, France;

² Biotherapy (CIC-BTi) and Inflammation-Immunopathology-Biotherapy Department (DHU i2B), Hôpital Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75651, Paris, France;

³ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Department of Internal Medicine and Clinical Immunology, F-75013, Paris, France, Centre national de références Maladies Autoimmunes et systémiques rares et Maladies Autoinflammatoires rares

⁴ Laboratoire d'anatomopathologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁵ Service de Médecine Interne, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France

⁶ Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁷ Service de Médecine Interne, CHU Caen, France

⁸ Laboratoire d'anatomopathologie ; Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁹ Service de Chirurgie vasculaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Correspondence: David Saadoun, MD, PhD, Department of Internal Medicine and Laboratory I3 « Immunology, immunopathology, immunotherapy » UMR 7211 (CNRS/UPMC) INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.

Phone: + (33)(1) 42 17 80 88. Fax: + (33)(1) 42 17 80 33. E Mail: david.saadoun@aphp.fr

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Objective: To compare microarray gene analysis of patients with Giant cell arteritis (GCA) to patients with Takayasu arteritis (TA).

Methods: We performed comparative microarray gene analysis of purified CD4⁺ T cells of TA (n=14) and GCA (n=15) patients.

Results: Sixty-seven genes were differentially expressed in CD4⁺ T cells of TA compared to GCA patients, among which CXCR5, CCR6 and CCL20 were overexpressed in TA. CXCR5⁺ CD4⁺ T Follicular helper cells (Tfh) were significantly higher in TA patients as compared to GCA and healthy donors (HD) [median proportion of CXCR5⁺ CD4⁺ T cells of 15.4 (10;30.8)% in TA versus 5.3 (1.4; 12.2)% in GCA ($p<0.0001$) and 9.7 (5.6; 12.5)% in HD ($p=0.0001$)]. Among Tfh subpopulations, Tfh-17 cells (defined as CXCR5⁺ CCR6⁺ CXCR3⁻ CD4⁺ T cells) were specifically increased in TA. We found higher proportion of tertiary lymphoid structures composed of CXCR5⁺, CD4⁺, PD-1⁺ and CD-20⁺ cells in inflammatory aortic lesions in TA as compared to GCA. We demonstrated increased proportion of peripheral and aortic B cells and BAFF levels in TA. CXCR5⁺ CD4⁺ T cells of TA patients helped B cells to differentiate into memory cells, to proliferate and to secrete type G immunoglobulins. IL-21 blocking was associated with a decrease of CD27⁺ B cells and IL-17-secreting T cells but an increase of regulatory T cells in TA patients.

Conclusion: Our data provide evidence of the key coordinated role of Tfh and B cells in tertiary lymphoid structures in TA and suggest an antigenic trigger.

Introduction:

Takayasu's arteritis (TA) and giant cell arteritis (GCA) are the two most common types of large vessel vasculitis (LVV). TA and GCA have been considered as distinct diseases on the basis of differences in age at disease onset, ethnic distribution and clinical features including predilection for certain arterial territories. Histological lesions of GCA are characterized by granulomatous inflammation affecting particularly the media, comprising epithelioid macrophages and giant cells usually accompanied by lymphoplasmacytic infiltrate in the adventitia. The inner half of the aorta is more often affected than the outer half and adventitia in GCA lesions. Intimal hyperplasia is often observed whereas the adventitia is relatively spared in comparison with TA. TA is characterized by a diffuse granulomatous inflammatory infiltrates of the media, the media-intimal junction and the adventitia, often affecting the vasa vasorum. Scarring can be seen in the later phase, with dense adventitial fibrosis and great fibrous thickening of the intima. Aortic wall thickness is generally greater in TA than in GCA¹⁰⁹.

Pathological mechanisms in both diseases are not well understood. T cells have been shown to be critical in pathogenesis in GCA since the secretion of inflammatory cytokines was abolished when T cells were depleted in SCID mice grafted with human inflammatory temporal arteries¹³⁵. Both diseases are driven by Th1 and Th17 unbalanced immune responses^{137,155}. Moreover, activated dendritic cells (DC) are thought to play a pivotal in LVV^{136,149} and have been found within arterial inflammatory lesions. Recent data demonstrated that inhibitory signals by which DC provide stop signal to T cells (through PDL1 and PD1 interactions) were defective in GCA, emphasizing the regulatory importance of arterial DC in GCA pathogenesis^{149,186}. Specific toll like receptors (TLR) have also been shown to be overexpressed in GCA and associated with specific histological patterns^{151,187,188}. Moreover, associations between LVV and specific major histocompatibility complex (MHC) class II molecules (HLA-B52 in TA and HLA-DRB1*04 in GCA) have been demonstrated and oligoclonal repertoire of T cells sorted from inflammatory arteries have been reported in both diseases^{135,175}. Altogether, this data emphasizes the importance of interactions between antigen presenting cells (APC) and T cells and suggests the role of antigenic triggers, together promoting an uncontrolled immune response. However, specific activation pathways specifically involved in each disease are poorly known to date. In the present study, we aim at distinguishing specific

immune mechanisms involved in TA and GCA. We compared microarray gene analysis of purified CD4⁺ T cells of TA and GCA patients.

Methods

Patients

The study population consisted of 54 TA adult patients [median age: 32.4 years (27.2; 53.2)] and 52 patients with giant cell arteritis [median age of 74.7 (66.3; 83.2)] and 60 age and sex-matched healthy donors (HD). All TA patients fulfilled more than 3 of the 1990 American College of Rheumatology criteria for classification of TA¹⁵⁸. GCA patients fulfilled the international criteria for GCA¹⁵⁷. The study was approved by our institutional ethics review board and was performed according to the Helsinki declaration. Patients gave informed consent.

Transcriptomic data of CD4 cells

CD3⁺ T cells were isolated from PBMC of active TA (n=13) or GCA (n=14) patients by negative isolation using DYNABEADS® untouched™ Human T Cells Kit (ThermoFisher Scientific) according the instructions of the manufacturer. CD4 positive cells were then isolated from previous sorted T cells by positive selection using DYNABEADS® CD4 positive isolation kit according the instructions of the manufacturer. Total RNA from CD4 positive cells was extracted using the NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel), according the instructions of the manufacturer. Total RNA was quantified by a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Samples with RNA concentration <20ng/μl were excluded. For quality control, RNA dilution was performed using Agilent RNA 6000 Nano Kit and 1μL of the sample was run on the Nano chip using an Agilent 2100 electrophoresis bioanalyser. The quality of total RNA was assessed by the profile of the electropherogram and by the RNA integrity number that was included between 7.3 and 9.3. For Illumina Beadarrays, cRNA samples were prepared using Illumina TotalPre-96 RNA Amp kit (LifeTechnologies) and hybridized to Illumina Human HT-12 v4 Beadarrays.

Analysis of cytokine production in LVV patients

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 41 TA, 30 GCA and the 60 HD were stimulated for 4 hours with 0,05 μg/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mM (1μg/mL) ionomycin (Sigma-Aldrich). Culture supernatants were harvested and immediately frozen at -80°C. Quantitative determination of IL-17, IL-21 and IL-6 was performed in culture supernatant using Human Cytokine 25-Plex (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in accordance with the manufacturer protocol.

Analysis of cell surface markers and intracellular cytokines in PBMC by flow cytometry

PBMC of TA (n=13), CGA (n=14) patients or controls (n=14) were stained with the following conjugated monoclonal antibodies, at predetermined optimal dilutions, for 20 minutes at 37°C: CD4-APC-Alexa Fluor 750, CD45RA-PB (Beckman Coulter), CXCR3-

APC-Alexa Fluor 700, CXCR5-PE dazzle, ICOS-FITC, PD1-PE, CCR6-APC (BD biosciences). IL-17 staining (IL-17 efluor 660, ebiosciences) was performed using fixation/permeabilisation kit (BD cytofix-cytoperm) in accordance with the manufacturer protocol. Data were acquired using a Navios flow cytometer and analysed with the Kaluza analysis software (Beckman Coulter).

Immunohistochemistry

Detection of CXCR5⁺, PD1⁺, CD20⁺, and CD4⁺ cells was performed on fixed, paraffin-embedded samples (aorta) from 7 TA patients with active inflammatory arterial lesions, 7 GCA patients and non-inflammatory aorta. After dewaxing in baths of xylene and ethanol, slides were submitted to antigen retrieval by heating in citrate buffer pH 6.0. Blocking of endogenous peroxidase was performed. Before incubation with primary antibodies, Fc receptor was blocked with normal goat serum 5%. Slides were incubated over night with monoclonal mouse anti-human CD4 (dilution 1:50, Abcam) rabbit polyclonal anti-CXCR5 (dilution 1:20, Abcam), mouse monoclonal anti-PD1 (dilution 1:50, Abcam), monoclonal anti-CD20 (dilution 1:200, DAKO), or with isotype control: polyclonal Rabbit IgG or monoclonal mouse IgG (Abcam). Slides were then incubated for 30 minutes at room temperature with a biotinylated secondary antibody (1:250). To amplify the signal, Avidin-Biotin complex is then incubated with the tissue section and peroxidase was revealed by diaminobenzidine (DAB) in the presence of H₂O₂. Finally, slides were mounted in Mowiol, and evaluated under microscopy.

Gene expression quantification at the mRNA level

Quantification of mRNA expression was performed on paraffin-embedded aorta samples from TA (n=11) and GCA (n=20) patients and non-inflammatory aorta controls (n=3) but also on CD4 positive cells of TA (n=13) and GCA (n=14) patients. IL-17, ROR- γ t, CD20, PD-1, CXCR5 and CD-45 genes were analyzed. Briefly, total RNA was extracted using the High Pure FFPE RNA Isolation Kit (Roche) for aorta and NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel) for CD4 positive cells and reverse-transcribed using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. Gene expression was determined by real-time PCR. Each cDNA sample was amplified in triplicate using SYBR Green (Applied Biosystems) on 7500 FAST Real-time PCR System (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 65°C for 1 minute. Quantitative values were obtained from the threshold cycle (Ct) number at which the increase in the signal associated with exponential growth of PCR products began to be detected. *RPLPO* gene was used as an endogenous control and each sample was normalized on the basis of its RPLPO content and the expression of CD45. The primers were designed to span introns and are listed in supplementary Table.

Counting of B cells

Images were converted from Hamamatsu slide scanner native format ndpi to .tiff format to facilitate the workflow process under Fiji, an open source image processing toolbox. Most of the pre-established parameters of the (Hamamatsu) software were maintained for all the samples. Fiji was downloaded from <http://fiji.sc/Fiji> (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and used for image segmentation and analysis. For reliable and automated data analysis, we developed an efficient image analysis software solution as plugin to Fiji. Our plugin quantified the signal of the specific marked cells selectively and separately for the rest of the sample. First, the image brightness and contrast were changed to increase the contrast of the specific stained cells and then were separated from the background using a simple intensity threshold. Subsequently, our plugin generated a binary mask from the images of the respective marker after intensity thresholding. The binary masks were separately applied to the original channel and the specific marked regions were identified. Measurements of area and mean grey value were calculated and then processed under Microsoft Excel.

Cultures of B cells and T cells

CXCR5⁺ or CXCR5⁻ CD4⁺ T cells (50 000 cells each/well) of active TA (n=8) patients were cultured with 20 000 naïve B cells (defined as CD27⁻ IgD⁺ CD19⁺ cells) in the presence of a surperantigen (Cytostim, human, Miltenyi Biotec) (2µl per million of cells) in RPMI1640 complete medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS. Recombinant human IL-21 R Fc chimera protein (25µg/ml) or isotype (R&D systems) was added to culture medium. Proliferation by CFSE staining was performed at day 3 and differentiation of B cells by flow cytometry at day 8. Cytokine concentrations were determined in culture supernatants at day 8 by Multiplex® (Merck Millipore). The IgG and IgM concentrations were measured by ELISA (Human IgM, IgA and IgG quantitation Set, Bethyl Laboratories).

T cell differentiation

PBMCs of TA patients were cultured in RPMI medium 1640 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 2% penicillin-streptomycin (1×10^6 cells/ml) and stimulated in 48-well plates coated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies with or without human recombinant IL-21 (Biolegend) or IL-21 blocking (IL-21R/Fc, R&D systems) or isotype. After 5 days of culture, culture supernatants were harvested and immediately frozen. The proportion of IL-17 secreting cells and FOXP3^{hi}CD25^{hi} among CD4⁺ cells was determined by flow cytometry.

Results:

CXCR5, CCR6 and PD1 CD4⁺ T cells genes signature in TA

We performed a microarray gene analysis of purified CD4⁺ T cells of active GCA (n=14) and active TA (n=13) patients to analyse distinct molecular pathways involved in GCA and TA CD4⁺ T cells. Main clinical characteristics of these patients are indicated in **Table 1**. All patients were untreated except four TA patients who received low doses of glucocorticosteroids (<10mg daily) or immunosuppressants and two GCA patients (glucocorticosteroids >48h). We found that CD4⁺ T cells of GCA and TA patients exhibited distinct RNA signatures. Sixty-seven genes were differentially expressed in these two diseases. Thirty-two genes were significantly down-regulated whereas 35 were up-regulated in CD4⁺ T cells of TA patients as compared to those of GCA patients. Among the up-regulated genes, we found CXCR5, CCR6 and CCL20 (**Figure 1A**). Interestingly, among CD4⁺ T cells, CXCR5 and CCR6 genes are expressed by T Follicular Helper (TFH) cells in blood, in particular by TFH-17. As TA and GCA patients are characterized by different ages, we confirmed that the expression of CXCR5 was not correlated with the age of patients in both diseases (**Figures 1B and C**) and was also increased in TA patients who had never experienced treatment as compared to GCA ones without treatment experience. We next analysed transcriptomic data of CD4⁺ T cells in TA and GCA, by performing an independent component analysis (ICA). We showed that the gene signature leading to the best discrimination between the 2 diseases included CXCR5, CCR6 and PD1 genes that all were up-regulated in TA disease (**Figure 1D**). We confirmed the overexpression of CXCR5 mRNA in CD4⁺ T cells of TA patients as compared to GCA patients by qPCR (p=0.02).

Circulating CCR6⁺ CXCR5⁺ CD4⁺ T cells (TFH-17) are significantly increased in TA

We next confirmed the over-expression of CXCR5 by CD4⁺ cells in TA by flow cytometry. The proportion of CXCR5⁺ CD4⁺ cells [defined as circulating TFH (cTFH)] among CD4⁺ cells was dramatically higher in TA patients as compared to GCA patients or healthy donors (HD) [median proportion of CXCR5⁺ CD4⁺ T cells of 15.4 (10; 30.8) in TA versus 5.3 (1.4; 12.2) in GCA (p<0.0001) and 9.7 (5.6; 12.5) in HD (p=0.0001)] (**Figures 2A and B**). CXCR5⁺ cells were also higher in active TA patients as compared to inactive one (**Figure 2C**). Moreover, the proportion of total CXCR6⁺ cells among CD4⁺ T cells was also higher in

TA patients as compared to GCA patients or HD [18.5 (2.8; 35.5) in TA patients vs 4 (0.6; 10) in GCA patients ($p=0.001$) and 7 (1.8; 17.5) in HD ($p=0.01$)] (**Figure 2D**). The proportion of CXCR5⁺ CCR6⁺ cells among CD4⁺ cells was also increased [4.52 (1.07; 13.35) in TA vs 0.69 (0.13; 2.16) in GCA ($p=0.0001$) and 2.3 (0.3; 4.2) in HD ($p=0.02$)]. Blood CXCR5⁺ T cells in TA were predominantly composed of TFH-17 cells (**Figure 2E**). We also found that IL-17 and IL-6 were increased in culture supernatants of TA patients as compared to GCA patients [Levels of IL-17 of 79.2 (+109.9) pg/ml vs 17.3 (+21.6), $p=0.02$ and levels of IL-6 of 69.8 (+72.9) and 31.5(+26.8), $p=0.06$]. (**Figures 2F and G**) IL-17 and ROR γ t mRNAs were overexpressed in aorta of LVV aorta as compared to non-inflammatory aorta controls (**Figure 2H**). However, there was no significant difference between GCA and TA diseases. As IL-21 is implicated in Th17 and TFH responses, we evaluated correlations between IL-21 and IL-17. Frequency of IL-17⁺ CD4⁺ T cells was significantly correlated with the frequency of IL-21⁺ CD4⁺ T cells [$r^2=0.64$, $p<0.0001$] and levels of IL-17 in culture supernatants were also significantly correlated with those of IL-21 [$r^2=0.65$, $p<0.0001$] (**Figures 2I and J**).

Increased tertiary lymphoid structures and CXCR5⁺, CD4⁺, PD-1⁺ cells within inflammatory aortic lesions in TA patients

As TFH cells are highly present in germinal centres and ectopic lymphoid organs have been previously described in TA¹⁸⁹, we compared the presence of tertiary lymphoid structures in aortic wall of TA (n=12) and GCA (n=15) patients. All histological aorta samples with hematoxylin and eosin and Masson's trichome colorations were evaluated by the same pathologist. Interestingly, we confirmed that tertiary lymphoid structures were more frequently observed in aorta of TA patients as compared to GCA patients ($p<0.05$) (**Figures 3A and B**). Tertiary lymphoid organs (TLO) exhibited high expression of CXCR5 within their periphery in TA aorta, as for CD4 staining (**Figure 3C**). PD-1 was also expressed in these structures. We next compared the relative expression of CXCR5 and PD-1 genes within aorta biopsies of TA (n=8) and non-inflammatory (n=4) controls by quantitative PCR. TA aorta exhibited higher levels of CXCR5 and PD-1 mRNA as compared with non-inflammatory controls ($p=0.048$ and 0.04 , respectively) (**Figures 3D and E**).

Involvement of B cells in TA

As we highlighted increased cTFH cells in TA, we consequently studied the role of B cells in this disease. We found that the absolute number of peripheral CD19⁺ cells was significantly increased in active and untreated TA patients (n=23) as compared to active and untreated GCA patients (n=13) and HD (n=77) [268.6 (+131) vs 111.9 (+78.8) and 203 (+116.6), p=0.002 and 0.02 respectively] (**Figure 4A**). The frequency of CD19⁺ cells was also increased in active and untreated TA patients as compared to active and untreated GCA patients and HD [13.8 (+4)% vs 8.8 (+5)% and 11.6 (4.5)%, p=0.04 and p=0.0004 respectively] (**Figure 4B**). BAFF levels also tended to be higher in TA as compared to GCA patients and HD (p=0.058 and 0.06, respectively) (**Figure 4C**). Blood B cells in TA were composed of IgD⁺ CD27⁻ cells [54.3 (+24.6) %], IgD⁺ CD27⁺ [13.4 (+8.1) %], IgD⁻ CD27⁺ [25 (+16.9) %] and CD27⁺ CD38⁺ [11.2 (+8.3) %]. We did not find significant differences in B cells phenotype between TA patients and HD (**Figure 4D**). Histological analysis of TA lesions in aorta revealed major infiltrates of CD20 positive cells within tertiary lymphoid follicles whereas the expression of CD20 in inflammatory infiltrates was observed in GCA aorta but was weaker (**Figure 4E**). The surface area of CD20 positive cells was significantly higher in TA aorta as compared to GCA (p=0.01) (**Figure 4F**). Consistently, the relative expression of CD20 mRNA was higher in TA aorta as compared to GCA aorta (p=0.05) (**Figure 4G**).

CXCR5⁺ T cells efficiently help naïve B cells in TA

CXCR5⁺ or CXCR5⁻ CD4⁺ T cells of active and untreated TA (n=8) patients were cultured with naïve B cells (as defined by CD27⁻ IgD⁺ CD19⁺ cells) of the same patients in the presence of a superantigen. CXCR5⁺ T cells of TA patients induced a higher proliferation of B cells at day 3 as compared to CXCR5⁻ T cells of the same patients (n=3) (**Figure 5A**). Consistently, the proportion of CD19 cells was significantly increased in cocultures including CXCR5⁺ cells as compared to those including CXCR5⁻ cells at day 7 [33.8 (+12) % versus 24.9 (+6) %, p=0.008] (**Figure 5B**). The absolute number of CD19 cells also tended to be higher in the conditions including CXCR5⁺ cells (p=0.06). Moreover, CXCR5⁺ T cells of TA patients enhanced naïve B cells to differentiate in memory B cells. Indeed, the proportion of CD27⁺ B cells was increased within cocultures including CXCR5⁺ T cells [6.4 (+3.4) % vs

3.7 (+2.1) %, $p=0.008$] (**Figures 5C and D**). Consistently, the secretion of IgG by B cells in cocultures including CXCR5⁺ T cells was higher than those with CXCR5⁻ CD4⁺ T cells ($p=0.04$) (**Figure 5E**). However, levels of secreted IgM tended to be decreased in B cells cultured with CXCR5⁺ T cells as compared to those cultured with CXCR5⁻ T cells (**Figure 5F**).

Role of IL-21 in differentiation of T and B cells

First, we have shown that levels of IL-21 in culture supernatants of TA PBMC were higher as compared to HD ($p=0.026$) (**Figure 6A**). Consistently, frequency of IL-21⁺ secreting cells among CD4⁺ cells was higher in active TA patients as compared to inactive ones and HD (**Figure 6B**). To study the impact of IL-21 on differentiation of T and B cells, experiments on T and B cells differentiation were repeated by adding an inhibitor of IL-21 or human recombinant IL-21. We found that adding recombinant IL-21 led to an increase in IL-17 secreting CD4⁺ T cells but a decrease in regulatory T cells (Tregs) whereas neutralising IL21 was associated with a decrease in Th-17 cells and an increase in the proportion of Tregs. (**Figures 6C and D**) IL-21 blocking had no impact on IFN γ -secreting CD4⁺ T cells. The frequency of CD27⁺ B cells also tended to be decreased at day 7 in cocultures of B cells and CXCR5⁺ with neutralizing anti-IL-21 antibody ($p=0.06$), suggesting the positive impact of IL-21 in enhancing B cells differentiation by CXCR5⁺ T cells (**Figure 6E**). However, there was no difference in B cells proliferation when neutralizing anti-IL21 antibody was added.

Discussion

We have demonstrated a distinct gene signature of circulating CD4 T lymphocytes in TA patients as compared to GCA patients. Sixty-seven genes were differentially expressed, among which CXCR5, CCR6 and CCL20 were shown to be significantly up-regulated in CD4⁺ T cells of TA patients. Upregulation of CXCR5 and CCR6 was confirmed by flow cytometry. Blood CD4⁺ CXCR5⁺ T cells have been found in recent studies to have functional characteristics similar to TFH¹¹. Indeed, circulating CXCR5⁺ CD4⁺ T cells promote survival, proliferation and differentiation of B cells into plasma cells¹¹. However, the phenotype of circulating TFH differs from "conventional" tissue-specific TFH cells that express high levels of PD-1 and ICOS. In blood, only few CXCR5⁺ CD4⁺ T cells express ICOS or PD-1. Circulating TFH can be distinguished according their membrane expression of CCR6 and CXCR3 and their cytokine secretion. TFH-1 cells are defined as CXCR3⁺CCR6⁻ cells and secrete higher levels of IFN γ , whereas TFH-2 cells are CXCR3⁻CCR6⁻ and produce increased levels of IL-4. Finally, TFH-17 cells, expressing CCR6 without CXCR3, produce high levels of IL-17⁸. In our study, we demonstrated an increase of CXCR5⁺ + CCR6⁺ + CXCR3⁻ CD4⁺ T cells, corresponding to TFH-17 population in TA patients. These data are consistent with previous data from the literature, showing an overexpression of TH-17 cytokines in untreated active LVV patients¹⁵⁵.

Consistently, histological analysis of aortic inflammatory lesions showed the presence of tertiary lymphoid organs that were significantly more frequent in TA as compared to GCA. Immunofluorescence analysis of arterial tertiary lymphoid structures revealed the presence of CD4⁺, CXCR5⁺ and CD20⁺ cells. Our data are consistent with another recent study that has reported the presence of tertiary lymphoid structures within TA aortic inflammatory lesions¹⁸⁹. Although these tertiary lymphoid organs are more frequent in TA, similar structures have recently been described in temporal arteries of GCA patients¹⁹⁰. Indeed, Ciccia et al. have recently demonstrated in temporal arteries of GCA patients the presence of tertiary lymphoid structures, composed of high endothelium venules and associated with an overexpression of CXCL13, CXCR5, lymphotoxin B and BAFF¹⁹⁰.

Although ectopic lymphoid structures may be related to chronic inflammation and may be encountered in other disease¹³, the implication of CXCR5⁺ T cells and tertiary lymphoid organs in TA pathogenesis may also support the hypothesis of antigenic stimulation triggering

the chronic inflammatory process. Consistently, some studies over 20 years ago have demonstrated an oligoclonal profile of CD4 T cells sorted from inflammatory aortas, strongly suggesting a local antigenic stimulation¹⁷⁵. However, these studies used sequencing methods significantly less sensitive than current methods and needed to be confirmed by more sensitive sequencing techniques. Many studies have attempted to demonstrate a causal link between the occurrence of large vessel vasculitis and an infectious trigger. The increased prevalence of TA in geographic areas characterized by high prevalence of *Mycobacterium Tuberculosis* and concomitant occurrence of TA and tuberculosis in some patients suggest a causal association between tuberculosis and TA. Similarly, some studies have found an increased prevalence of anti-mycobacterial tuberculosis antibodies, in particular anti-HSP65 and HSP60 antibodies in TA as compared to healthy subjects^{133,191}. Molecular similarities between HSP65 and some human HSPs leading to cross-reactivity have been proposed to explain vascular autoimmune process after tuberculosis infection.¹⁹² However, more recent studies did not provide consistent data and did not find the presence of *Mycobacterium Tuberculosis* DNA in arteries of TA patients^{134,193}.

Moreover, cytokine signaling markedly influences germinal center (GC) formation, TFH and B cells activation and differentiation. The pleiotropic cytokine IL-21 facilitates GC formation by promoting activation and differentiation of TFH cells and GC B cells^{1,194}. Consistent with these observations, we found in the present study increased levels of IL-21 in serum of TA patients. IL-21 blocking inhibited B cells differentiation into memory cells. In cooperation with IL-21, IL-6 also promotes the formation of GC B cells and the differentiation of TFH cells^{1,8}. TA lesions are known to be driven by unbalanced TH17 immune response. High levels of IL-6, known to induce TH17 immune responses, were previously shown in serum and inflammatory lesions of TA patients. Levels of IL-6 were also strongly correlated with disease activity¹⁹⁵. IL-21 has been also shown to enhance unbalanced Th17 response in LVV¹⁹⁶. Here, we found a significant correlation between IL-21 and IL-17 production in TA. In encephalomyelitis mouse model, TH17 cells induced the formation of ectopic lymphoid follicles in inflammatory brain lesions via IL-17¹⁹⁷. Given that early developmental pathways for TFH and TH17 cells are partially shared in humans (namely including IL-6 and IL-23 cytokines), we may speculate that TFH17 cells might be involved in the formation of ectopic GCs in autoimmune diseases¹³.

B cell activation is probably also relevant to the pathogenesis of TA. Indeed, our results support the implication of B-T cells cooperation in TA. Consistently, our study confirmed

increased B cells number in blood and also within the arterial lesions of TA patients as compared to GCA patients. Similarly, serum levels of BAFF tended to be higher in TA. Only few data have been published on B cells in TA. A recent study has reported an increased absolute number and frequency of peripheral blood CD19(+)/CD20(-)/CD27(high) antibody-secreting cells in patients with active TA¹⁹⁸. The accumulation of B cells within TA inflammatory lesions as well as their organization in TLOs emphasizes the role of B cells activation in TA pathogenesis. Analysis of immune adventitial cells revealed a high percentage of cells expressing canonical TFH cell markers, such as CXCR5 and PD-1. These TFH cells orchestrate B-cell activation, proliferation and differentiation. A previous study showed in lupus mouse model that extrafollicular TFH cells facilitate IgG production by B cells through interactions between CD40 and CD40L, interactions between inducible T cell co-stimulator (ICOS) and ICOS ligand (ICOSL), and the secretion of interleukin-21 (IL-21)¹⁹⁹. Moreover, TFH cells produce high levels of BAFF in germinal centers, which promotes the positive selection of autoreactive B cell clones, thereby implicating BAFF in the pathogenesis of GC-dependent autoimmunity¹⁹⁴. Consequently, our results suggest the presence of pathogenic or non-pathogenic autoantibodies in TA which may have a diagnostic and/or prognostic value. Indeed, many studies have attempted to demonstrate the presence of autoantibodies in TA (antiphospholipids, anti-endothelial cells, anti-ferritin antibodies)^{200,201}. Anti-endothelial cells antibodies were found to be increased in TA and to lead to endothelial activation via increased levels of VCAM, E-Selectin and secretion of IL-8 and IL-6²⁰¹. Anti-endothelial cell IgM were also correlated with disease activity²⁰². However, these antibodies were not specific of TA.

Finally, the role of B cells in TA could support the use of rituximab in this disease. However, data on rituximab efficacy in TA are scarce and mainly based on case-reports.¹⁹⁸ In GCA, some studies reported a decrease in circulating B cells in patients with active GCA. The number of B lymphocytes normalized rapidly under treatment. As few B lymphocytes were found within inflammatory lesions of temporal arteries, trapping of B cells at inflammatory sites unlikely explains peripheral decrease of B cells¹⁴⁵.

In summary, our data provide evidence of the implication of TFH in the pathogenesis of inflammatory lesions in TA. These advances suggest the role of antigenic trigger participating in pathological immune response in TA and the implication of B-T cells cooperation.

Legends

Figure 1: CD4⁺ T cells of GCA and TA patients have distinct transcriptomic profiles

- A. A microarray gene analysis of purified CD4⁺ T cells of active GCA (n=14) and active TA (n=13) patients was performed. CD4⁺ T cells of GCA and TA patients exhibited distinct RNA signatures. CXCR5, CCR6 and CCL20 were significantly up-regulated in TA patients as compared with GCA patients.
- B-C. The expression of CXCR5 was not correlated with the age of patients in both diseases.
- D. ICA analysis revealed that the gene signature leading to the best discrimination between GCA and TA included CXCR5, CCR6 and PD-1 genes.

Figure 2: Increase in CXCR5⁺ CD4⁺ cells in TA

- A. The membrane expression of CXCR-5, CCR-6 and CXCR-3 was analysed among CD4⁺ T cells of TA (n=13), GCA (n=14) patients and HD (n=14) by flow cytometry. Dot plots represent the proportion of CXCR5⁺ CD4⁺ T cells and CXCR5⁺ CCR6⁺ CD4⁺ T cells in one TA patient (top panel) and one GCA patient (bottom panel).
- B. The increased frequency of CXCR5⁺ cells in CD4⁺ cells of TA patients in comparison with GCA patients and HD was confirmed by flow cytometry. $**P<0.01$ $***P<0.001$ These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- C. The frequency of CXCR5⁺ cells was higher in active TA patients (n=13) in comparison with inactive TA patients (n=8). $**P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- D. The frequency of CXCR5⁺ CXCR6⁺ cells was also higher in CD4⁺ T cells of TA patients as compared to GCA patients or HD. $*P<0.05$, $***P<0.001$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- E. The proportion of TFH-17 cells was higher in TA as compared to GCA patients and HD. $*P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- F. PBMC of TA (n=41), GCA (n=30) patients and HD (n=20) were stimulated for 4 hours with 0.05 μ g/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mM (1 μ g/mL) ionomycin. Quantitative determination of IL-17, IL-6, IFN γ , IL-4 and IL-13 was performed in culture supernatants. Levels of IL-17 was significantly higher in TA patients as compared with GCA patients. $*P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- G. Levels of IL-6 tended to be higher in TA patients as compared with GCA patients. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- H. Relative expression of IL-17 and ROR γ t mRNAs in aorta of LVV aorta (n=14) as compared to non-inflammatory aorta controls (n=3). $*P<0.05$
- I. The frequency of IL-17⁺ CD4⁺ T cells in TA patients (n=30) was significantly correlated with the frequency of IL-21⁺ CD4⁺ T cells [$r^2=0.64$, $p<0.0001$]
- J. Levels of IL-17 in culture supernatants (n=30) were also significantly with those of IL-21 [$r^2=0.65$, $p<0.0001$]

Figure 3: Increase in tertiary lymphoid organs within arterial inflammatory lesions of TA

- A. Histological analysis of TA aorta revealed the presence of tertiary lymphoid organs (TLO) in the adventitia (black narrows) Magnification x 2 and 10, respectively. (a-b). High endothelium venules (HEV) were observed within TLO (black narrow) Magnification x 40. (c). Histological analysis of GCA aorta reveals inflammatory infiltrates without nodular and follicular organization. Magnification x 2. (d).
- B. The presence of TLO in the aortic wall of TA (n=10) and GCA (n=15) patients was compared. TLOs were more frequently observed in TA patients as compared to GCA patients. $*P<0.05$ These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- C. Analysis of tertiary lymphoid structures in TA aorta by immunohistochemistry revealed a high expression of CXCR-5 within the periphery of lymphoid structures (a-b). Lymphoid structures also contained CD4⁺ T cells in their periphery (c) and cells with positive staining for PD-1 (d).
- D. Relative expression of CXCR5 and PD-1 mRNA within aorta biopsies of TA (n=8) patients and non-inflammatory (n=4) controls was assessed by qPCR. TA biopsies exhibited higher relative expression of CXCR-5 and PD-1 mRNA as compared with non-inflammatory controls. $*P<0.05$ These data are shown as the mean $\pm$ SEM

Figure 4: Increase in B cells in TA patients

- A. Absolute number of peripheral CD19⁺ cells was significantly increased in active and untreated TA patients (n=23) as compared to active and untreated GCA patients (n=13) and HD (n=77). $*P<0.05$, $***P<0.001$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- B. Frequency of CD19⁺ cells was also increased in active and untreated TA patients (n=23) as compared to active and untreated GCA patients (n=13) and HD (n=77). $*P<0.05$, $***P<0.001$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- C. BAFF levels were measured in sera of TA patients (n=34), GCA patients (n=15) and HD (n=15). BAFF levels tended to be higher in TA as compared to GCA patients and HD.
- D. Comparative phenotype of peripheral B cells in TA patients (n=16) and HD (n=7).
- E. Histological analysis of TA aorta revealed major infiltrates of CD20 positive cells within TLO (a) whereas the presence of CD20⁺ cells was weaker in GCA without nodular organization (b).
- F. Surface area of CD20 positive cells in TA (n=7) and GCA (n=7) aorta. $*P<0.05$
- G. Relative expression of CD20 mRNA in aorta of TA (n=12) and GCA (n=16) patients.

Figure 5: CXCR5+ CD4+ T cells help efficiently naïve B cells in TA

- A. CXCR5+ or CXCR5- CD4+ T cells were cultured with naïve B cells (defined as CD27- IgD+ CD19+ cells) with stimulation with a surperantigen. Proliferation of B cells was assessed at day 3 by CFSE staining. Dot plots of 3 TA patients are represented (P1, P2 and P3). The proportion of proliferative B cells was higher in B cells cultured with CXCR5+ CD4+ T cells as compared to those cultured with CXCR5- cells.
- B. The proportion of CD19+ cells was significantly higher at day 7 in cocultures including CXCR5+ T cells as compared to those with CXCR5- cells. Results of 8 active TA patients are shown. $**P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- C. The proportion of CD27+ B cells was significantly higher at day 7 in cocultures including CXCR5+ T cells as compared to those with CXCR5- cells. Results of 8 active TA patients are shown. $**P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- D. The proportion of CD27- B cells was significantly higher at day 7 in cocultures including CXCR5- T cells as compared to those with CXCR5+ cells. Results of 8 active TA patients are shown. $**P<0.01$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- E. Measurement of IgG secretion was performed in culture supernatant (n=9) of naïve B cells cultured with CXCR5+ or CXCR5- cells. Levels of IgG were higher in B cells cultured with CXCR5+ T cells. $*P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- F. Levels of IgM in naïve B cells cultured with CXCR5+ or CXCR5- T cells. $*P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM

Figure 6: Role of IL-21 in differentiation of T cells and B cells

- A. PBMC of TA (n=38), GCA (n=25) patients and HD (n=57) were stimulated for 4 hours with 0.05 μ g/mL Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and 1 mM (1 μ g/mL) ionomycin. Levels of IL-21 in culture supernatants of TA PBMC were higher as compared to HD. $*P<0.05$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- B. Frequency of IL-21 secreting CD4+ T cells was compared in active TA (aTA) patients (n=11), TA patients (n=19) in remission (rTA) and HD (n=20). $***P<0.0001$. These data are shown as the mean $\pm$ SEM
- C. PBMCs of 3 TA patients were stimulated with anti-CD3/CD28 monoclonal antibodies for 5 days with or without recombinant human IL-21 (rHu-IL-21) or with or without inhibitor of IL-21 (IL-21R/Fc). rHu-IL-21 led to increased frequency of IL-17 secreting CD4+ T cells whereas IL-21 blocking resulted in decrease in IL-17 secreting CD4+ T cells.
- D. rHu-IL-21 led to decreased frequency of Tregs whereas IL-21 blocking resulted in increase in Tregs.
- E. CXCR5+ CD4+ T cells were cultured with naïve B cells in the presence of a surperantigen with or without IL-21 blocking. Dot plots represent the proportion of CD27+ B cells cultured with isotype (top panel) and neutralising IL-21R/Fc (bottom panel) in 1 TA patients. The frequency of CD27+ B cells tended to decrease at day 7 in the presence of neutralising IL-21R/Fc (p=0.06). Results of 5 TA patients. These data are shown as the mean $\pm$ SEM

Table 1: Main characteristics of LVV patients included in transcriptomic analysis

	TA (n=13)	GCA (n=14)
Clinical characteristics		
Female patients, n(%)	11 (85)	12(63,2)
Median Age (years) [min; max]	38,8 [17; 68]	79,5 [58; 95]
Active disease, n(%)	13 (100)	14 (100)
Aortitis for GCA patients, n (%)	NA	6 (43)
Aortic aneurysm, n(%)	3 (21)	2 (14)
Stroke, n(%)	1 (8)	2 (14)
Myocardial infarction, n(%)	0 (0)	0 (0)
Ocular complications, n(%)	0 (0)	3 (21)

Figure 1

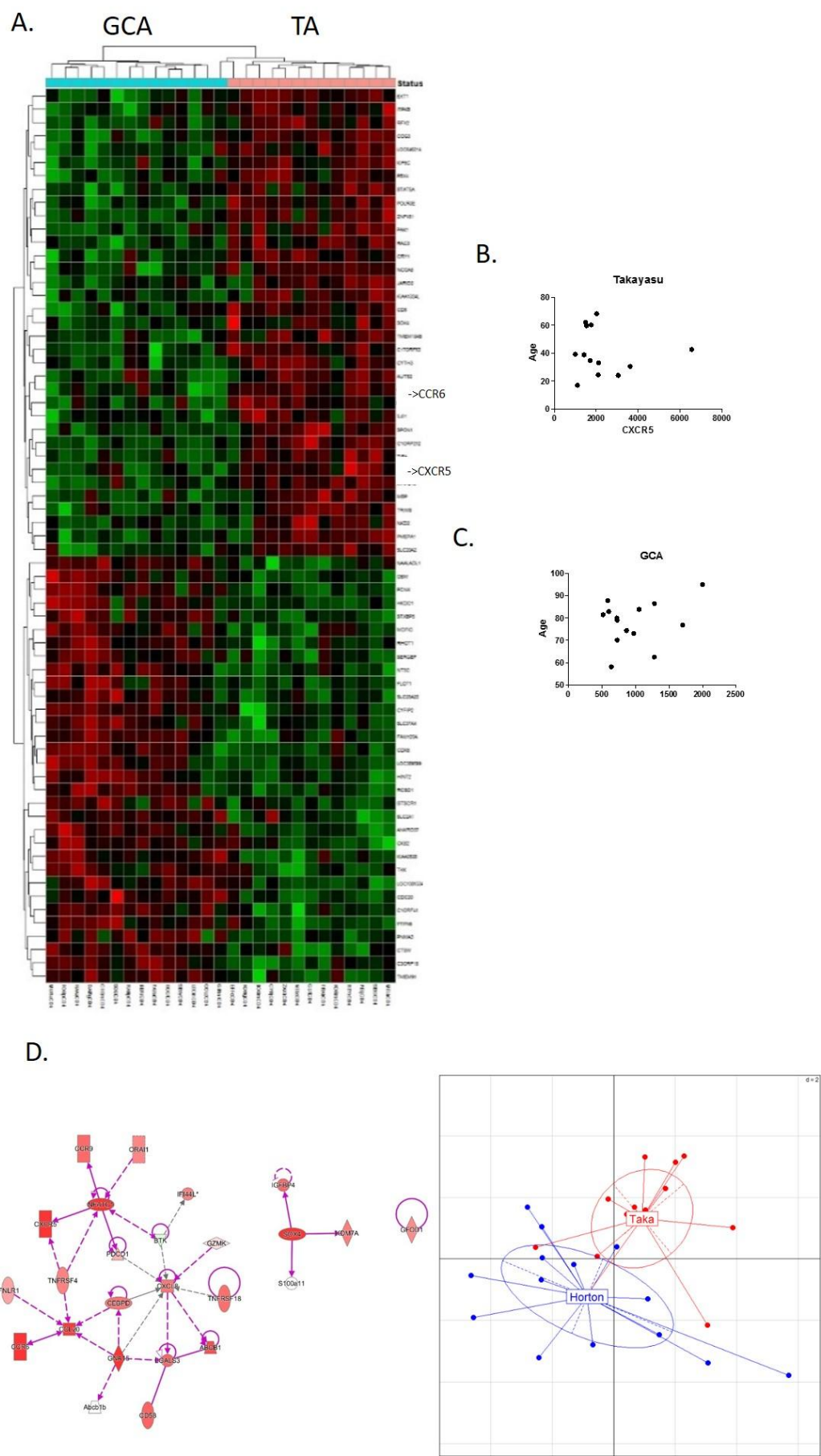


Figure 2

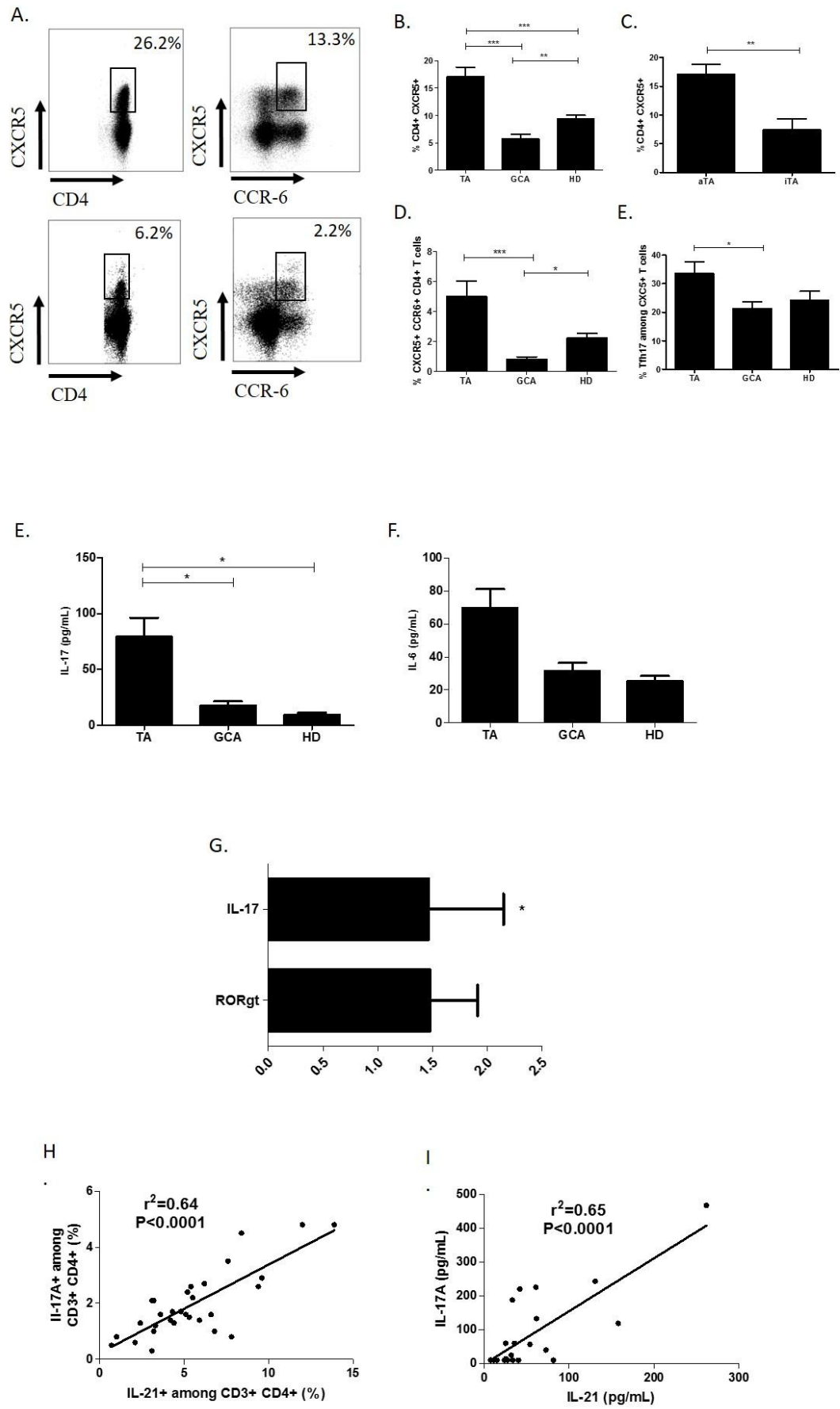
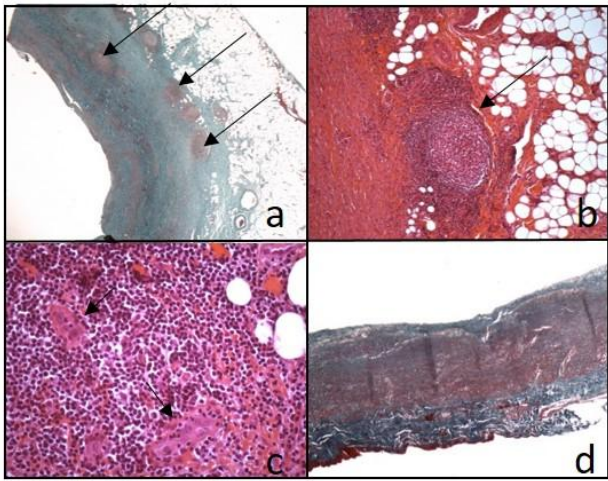
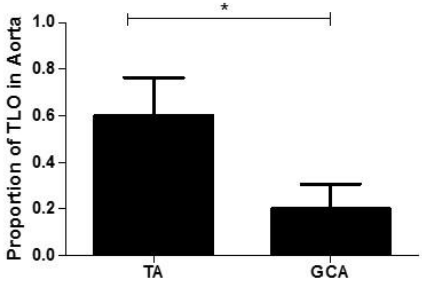


Figure 3

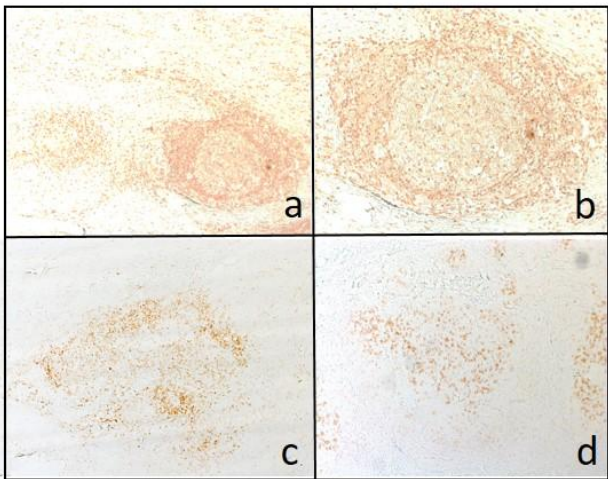
A



B



C



D

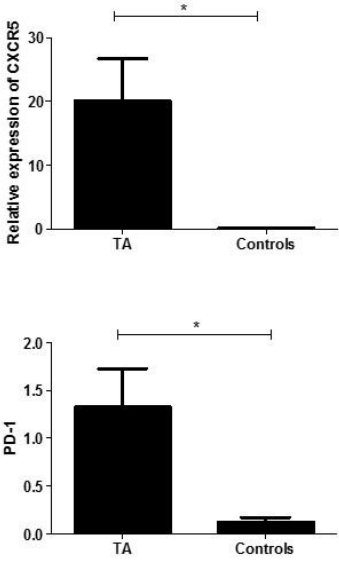


Figure 4

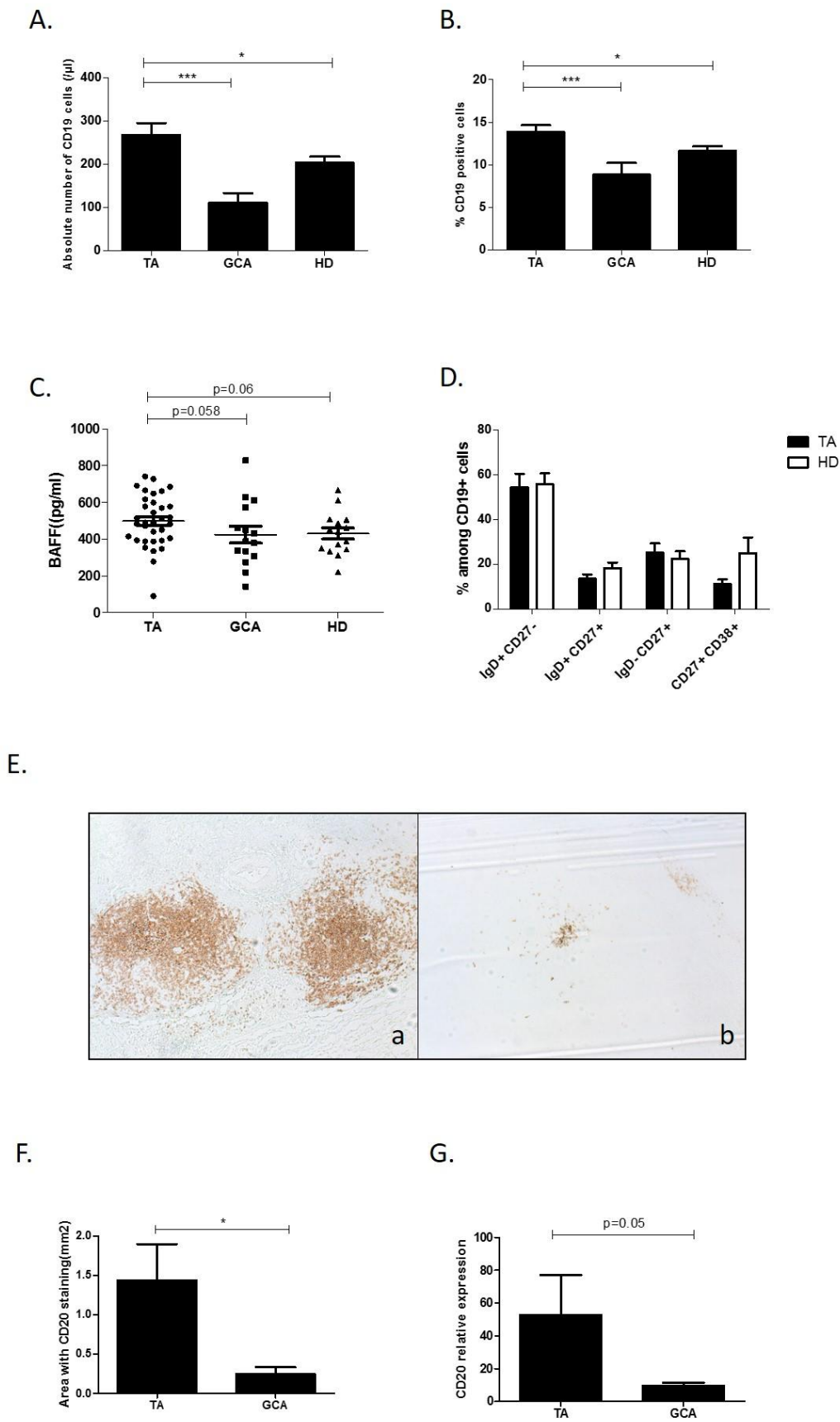


Figure 5

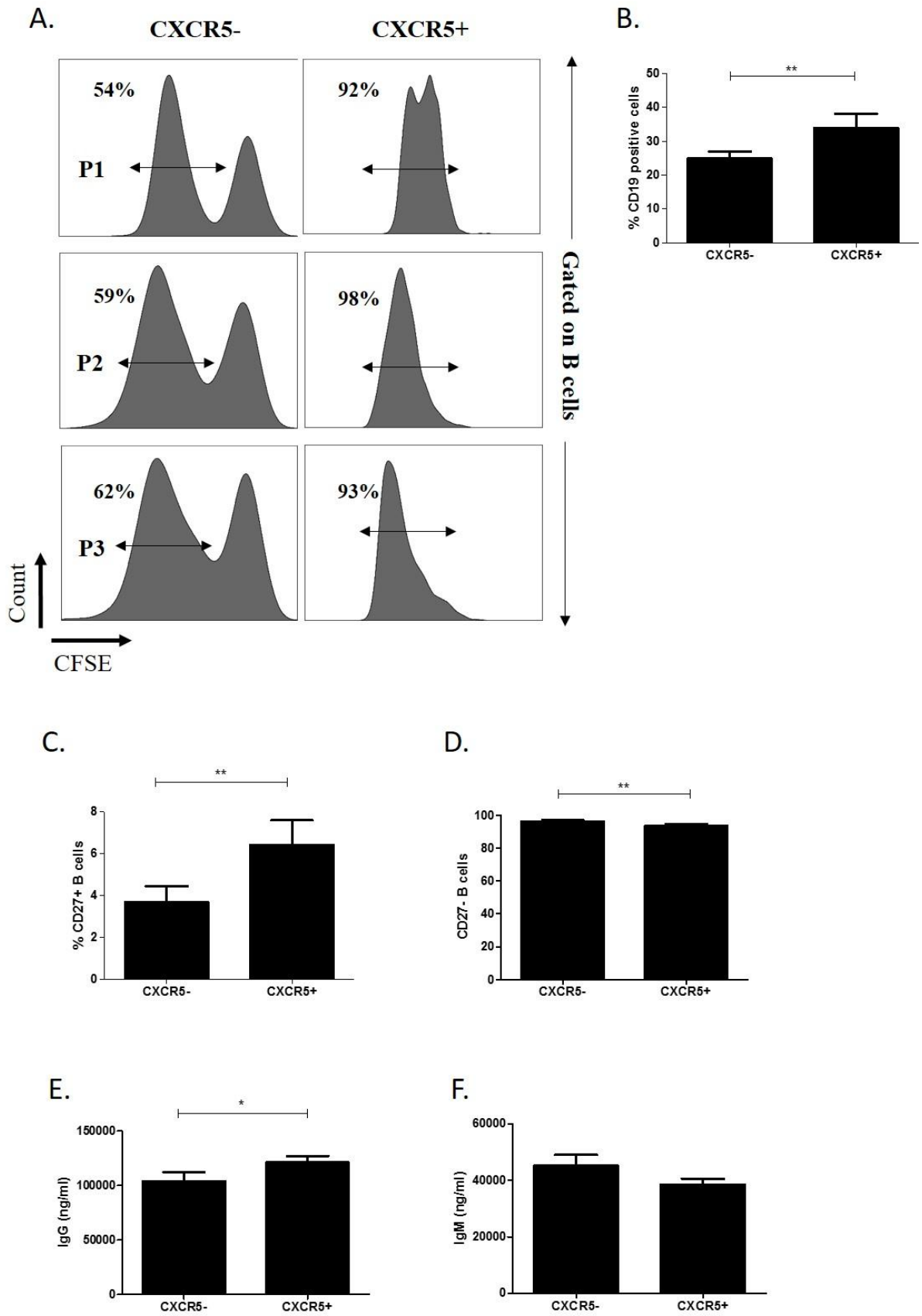
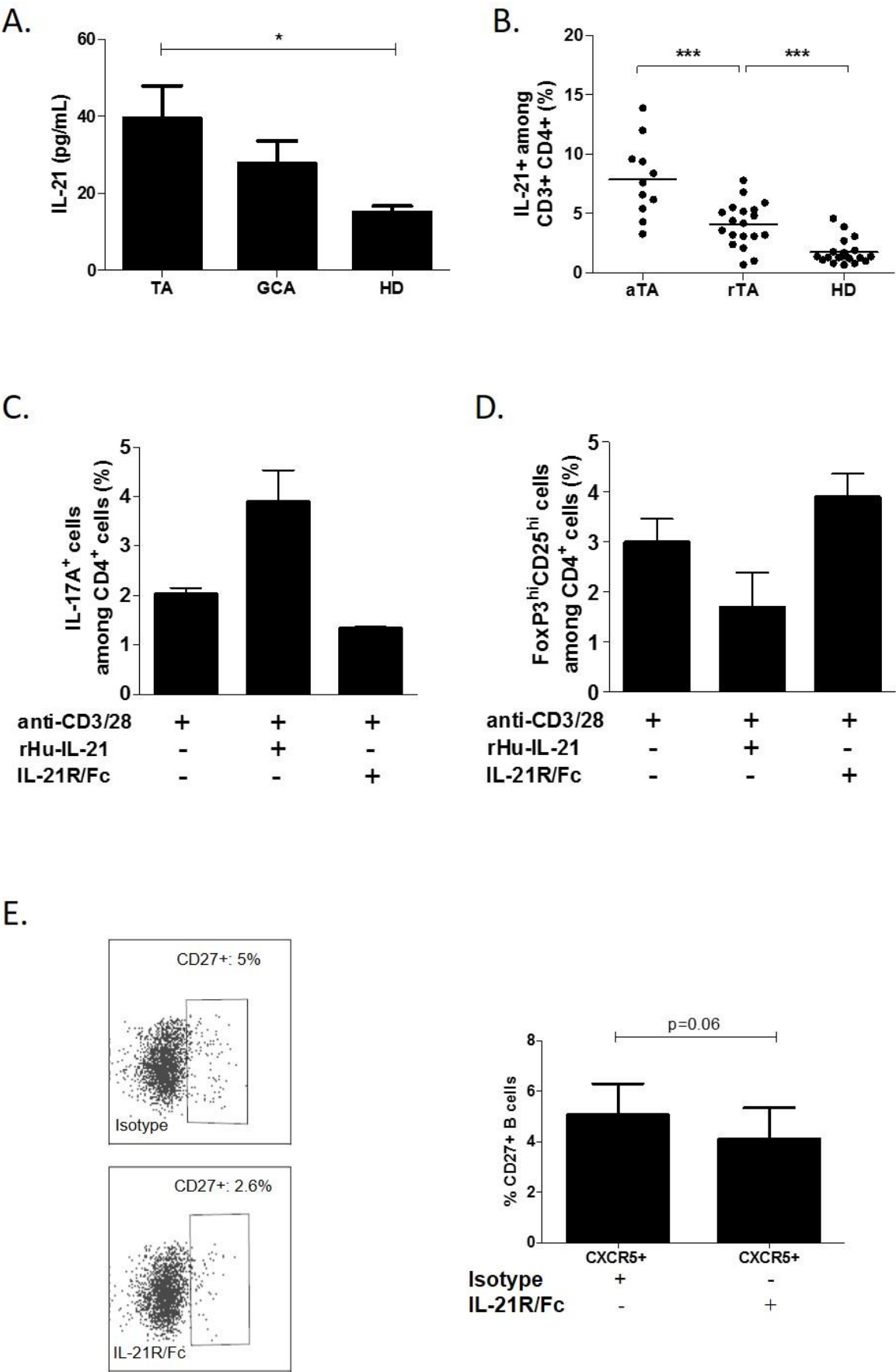


Figure 6



D-Discussion

Nous avons étudié dans nos différents travaux les mécanismes communs de régulation de la réponse immune, d'angiogenèse et de réparation tissulaire, ainsi que certains mécanismes distinctifs dans la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes. Nous avons montré dans ces vascularites l'implication des lymphocytes Tfh qui semblent avoir un rôle particulièrement prépondérant dans la maladie de Takayasu. Nous avons également mis en évidence le rôle de l'IL-33 et des mastocytes, qui constituent des mécanismes communs de régulation de la réponse immune, de l'angiogenèse et de réparation tissulaire.

1- Lymphocytes T Folliculaires *Helper* et vascularites des gros vaisseaux

1a-Rôle des lymphocytes T Folliculaires *Helper* dans la maladie de Takayasu

L'analyse des données du transcriptome des lymphocytes T CD4⁺ de patients ayant une artérite à cellules géantes ou une maladie de Takayasu a permis de mettre en évidence un profil de différenciation distinct de la sous-population lymphocytaire T CD4⁺ dans ces deux maladies. Nous avons ainsi montré une surexpression de CXCR5 et CCR6 par les lymphocytes CD4⁺ de patients ayant une maladie de Takayasu. Ces données ont été confirmées à la fois en PCR quantitative et cytométrie en flux. Des études récentes ont montré que les lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ sanguins avaient des caractéristiques fonctionnelles proches de celles des lymphocytes Tfh tissulaires et sont désignés sous le nom de « Tfh circulants ». Ces études ont démontré que cette sous-population CXCR5⁺ CD45RA⁻ correspondait à une population CD4⁺ mémoire, favorisant la survie et la prolifération des lymphocytes B, leur commutation isotypique et de ce fait leur différenciation en plasmocytes

capables de sécréter des IgG et IgA ¹¹. Comme discuté dans l'introduction, on distingue les Tfh-1, 2 et 17 en fonction de leur expression membranaire de CCR6 et CXCR3 et de leur sécrétion cytokinique. Les Tfh-1 (CXCR3⁺ et CCR6⁻) sécrètent des taux plus importants d'IFN γ , alors que les Tfh-2 (CXCR3⁻ et CCR6⁻) produisent des taux importants d'IL-4. Les Tfh-17 (CCR6⁺ et CXCR3⁻) produisent des taux élevés d'IL-17 ¹³. Dans notre étude, nous avons mis en évidence chez les patients ayant une maladie de Takayasu une augmentation des lymphocytes T CD4⁺ CXCR5⁺ CCR6⁺ CXCR3⁻ correspondant à la sous-population Tfh-17. L'analyse histologique des lésions inflammatoires aortiques a mis en évidence la présence d'organes lymphoïdes tertiaires significativement plus importants dans la maladie de Takayasu que dans l'artérite à cellules géantes. L'analyse en immunofluorescence de ces structures lymphoïdes révélait la présence de lymphocytes T CD4⁺, ainsi que de cellules CXCR5⁺, à la fois au centre et en périphérie des follicules et de lymphocytes CD20⁺. La présence au sein des artères pathologiques d'organes lymphoïdes tertiaires composés de cellules CXCR5⁺ suggère fortement une implication directe des Tfh dans les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Takayasu. Si ces structures lymphoïdes tertiaires sont plus fréquentes dans la maladie de Takayasu dans notre étude, elles ont toutefois été récemment décrites dans les artères temporales de patients ayant une artérite à cellules géantes. En effet, Ciccia et al. ont récemment rapporté la présence de structures artérielles évocatrices d'organes lymphoïdes tertiaires dans les artères temporales de patients ayant une artérite à cellules géantes, riches en *high endothélium veinules* (HEV), caractéristiques des centres germinatifs, qui seraient associées à la surexpression de CXCL13, CXCR5, lymphotoxine B et BAFF ¹⁹⁰. Cependant, la nature exacte de ces structures n'était pas clairement définie, ce qui ne nous permet pas de confirmer définitivement s'il s'agit des mêmes structures que celles décrites dans notre étude.

La signification de la présence d'organes lymphoïdes tertiaires dans les aortes de patients ayant une maladie de Takayasu mérite d'être discutée. La présence de telles structures a été décrite au sein de lésions inflammatoires chroniques dans certaines pathologies autoimmunes comme le lupus ou le syndrome de Gougerot-Sjögren ¹³. Dans certains cas de néphrites lupiques tubulo-interstitielles, ces lésions ont été mises en évidence ²⁰³. Plusieurs aspects peuvent alors être discutés. S'agit-il d'une organisation secondaire de la réponse inflammatoire ou d'un évènement précoce dans la réponse immune ? Quels en sont les déterminants ? Quelles en sont les conséquences ?

Les mécanismes menant au développement de telles structures dans certaines pathologies, plus fréquemment que dans d'autres, ne sont pas connus. Néanmoins, la présence de structures lymphoïdes ectopiques plus fréquentes dans la maladie de Takayasu suggère que ces lésions ne sont vraisemblablement pas le simple reflet d'un processus inflammatoire chronique. Les lymphocytes Th17, particulièrement impliqués dans la maladie de Takayasu¹³¹, pourraient être impliqués dans la survenue de telles lésions²⁰⁴. La corrélation entre la sécrétion d'IL-17 et d'IL-21 dans notre étude pourrait conforter cette hypothèse. De même, l'IL-6 a également été montrée comme étant une cytokine majeure dans la différenciation Tfh mais également dans la différenciation Th17 ^{15,194}. Les cytokines intervenant dans la différenciation des Tfh et des Th17 étant en partie communes (IL-6, IL-23), on peut en effet spéculer que les lymphocytes Th17 sont impliqués dans le développement de telles lésions ¹³. L'IL-21 est également connue pour être primordiale pour la différenciation des Tfh ^{1,194} et celle des lymphocytes B sécrétant des Ig ¹⁹⁴. Dans notre étude, nous confirmons le rôle de l'IL-21 dans la différenciation des lymphocytes B mais nous avons également démontré *a contrario* le rôle de l'IL-21 sur la polarisation Th17 puisque nous avons observé que l'IL-21 induisait une augmentation des lymphocytes Th17 et à l'inverse une diminution des lymphocytes Treg. D'autres cytokines sont importantes dans la

différenciation Tfh comme certaines cytokines Th1, notamment l'IL-12. Le TGF- β , en association avec l'IL-12 et l'IL-23 (cytokine pro-Th17), favoriserait la différenciation en Tfh¹². Récemment, une étude a montré que le TSLP et l'environnement cytokinique Th2 pouvaient également induire une différenciation Tfh²⁰⁵. Si l'environnement cytokinique local pourrait rendre compte en partie du développement de structures lymphoïdes tertiaires, ces lésions suggèrent également la présence d'autoantigènes artériels qui, via l'activation des BCR et des TLR de lymphocytes auto-réactifs, pourraient sélectionner les B auto-réactifs et conduire à l'activation des Tfh, aboutissant *in fine* à une réponse autoimmune dépendante des centres germinatifs¹⁹⁴. De tels processus pourraient être favorisés par le fait que certains autoantigènes soient rendus accessibles du fait des dommages tissulaires et des phénomènes d'apoptose liés à l'inflammation chronique vasculaire¹³. De plus, la présence de structures lymphoïdes tertiaires pourrait permettre la sélection de lymphocytes auto-réactifs. Dans ce sens, il avait été montré que les Tfh présents dans les structures lymphoïdes ectopiques induisaient la prolifération et la différenciation des lymphocytes B qui produisaient des auto-anticorps²⁰⁴. La présence de ces structures lymphoïdes pourrait alors favoriser la chronicisation d'une réponse immune inadaptée et la persistance de dommages tissulaires.

Les raisons expliquant les différences de fréquences de telles structures aortiques dans la maladie de Takayasu et l'artérite à cellules géantes ne sont pas connues. Différentes hypothèses pourraient être avancées comme des environnements cytokiniques différents (avec différentes associations cytokiniques) ou la différence d'âge des artères qui pourrait expliquer que certains autoantigènes soient révélés dans la maladie de Takayasu à la différence de l'artérite à cellules géantes.

1b-Stimulation antigénique et maladie de Takayasu :

L'implication des Tfhc dans la maladie de Takayasu replace au centre du débat le rôle d'une stimulation antigénique dans le processus inflammatoire chronique. Certaines études relativement anciennes ont voulu démontrer un lien de causalité entre la survenue d'une vascularite des gros vaisseaux et la présence d'un antigène infectieux. Certaines études suggéraient une association entre la tuberculose et la maladie de Takayasu. La prévalence accrue de la maladie de Takayasu dans certaines régions géographiques à forte prévalence de *Mycobacterium tuberculosis* d'une part et l'association de tuberculose et de maladie de Takayasu chez certains patients d'autre part étaient des arguments en faveur d'un lien entre ces deux maladies. Certaines études ont retrouvé une prévalence accrue d'anticorps anti-*Mycobactérium tuberculosis*, et notamment anti-HSP65 et HSP60, chez les patients ayant une maladie de Takayasu par rapport à des sujets sains ^{133,191}. La prolifération lymphocytaire T était plus importante chez les patients ayant une maladie de Takayasu par rapport aux témoins en présence de HSP65 et HSP60 ¹⁹¹. Certaines études suggèreraient un mimétisme moléculaire entre HSP65 et certaines HSP humaines, ce qui pourrait aboutir à une réponse autoimmune par des phénomènes de cross-réactivité¹⁹². Cependant, les données d'études plus récentes sont divergentes. L'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (séquence d'insertion IS6110, HSP65 et ARN16S) n'a été détecté ni dans les cellules mononucléées de 32 patients, ni dans les 10 artères de patients ayant une maladie de Takayasu ¹³⁴. Ces données sont cohérentes avec celles d'une étude française plus ancienne ne retrouvant jamais la présence de *Mycobacterium tuberculosis* (par coloration à l'auramine, cultures et test d'amplification directe) dans 10 artères de patients ayant une maladie de Takayasu [lésions actives (n=5)] ^{132,193}. Une étude turque n'a pas retrouvé de différence de taux de positivité du quantiféron® chez les patients ayant une maladie de Takayasu (n=94) en comparaison à une population contrôle de 107 sujets ²⁰⁶. D'autres études se sont intéressées à d'autres antigènes non infectieux comme *trigger* de la maladie de Takayasu. Certaines études ont montré une

prolifération des PBMC plus importante chez les patients avec une maladie de Takayasu mises en culture avec des protéines purifiées d'aorte humaine en comparaison aux témoins. Cependant, à l'heure actuelle, aucun antigène infectieux ou auto-antigène n'a été identifié de manière certaine et définitive.

D'autres études très anciennes (plus de 20 ans) ont mis en évidence un profil oligoclonal des lymphocytes T triés à partir d'aortes inflammatoires^{175,207}. Ces données suggéraient également une stimulation antigénique locale qui serait responsable d'une restriction du répertoire des lymphocytes T CD4+. Cependant, ces études utilisaient des méthodes de séquençage nettement moins sensibles que les techniques actuelles et nécessitent d'être confirmées par des techniques plus sensibles de séquençage.

Outre le rôle possible des lymphocytes Th17 dans le développement des organes lymphoïdes tertiaires artériels, nos données posent la question d'un antigène artériel induisant ou favorisant une réponse inflammatoire artérielle persistante. La mise en évidence d'une population lymphocytaire CD4+ CXCR5+ circulante pourrait être un élément majeur dans la mesure où elle est aisée à étudier et pourrait être un « témoin » périphérique de la réponse immune locale. Il s'agit donc de données préliminaires prometteuses qui incitent à poursuivre les études pour mieux caractériser cette population Tfh circulante, afin de déterminer sa spécificité antigénique et éventuellement identifier à terme un marqueur diagnostique et/ou pronostique de la maladie.

1c-Rôle des lymphocytes B dans la maladie de Takayasu

Nos résultats mettent en exergue le rôle des lymphocytes B dans la maladie de Takayasu. L'augmentation de lymphocytes T CD4+ CXCR5+ et la présence d'organes lymphoïdes tertiaires au sein des lésions inflammatoires artérielles dans la maladie de Takayasu plaident en faveur de l'implication d'une coopération B/T. Nos données ont mis en évidence une

augmentation des lymphocytes B au niveau périphérique mais également au sein des lésions artérielles dans la maladie de Takayasu en comparaison à l'artérite à cellules géantes. Les taux sériques de BAFF étaient plus élevés chez les patients ayant une maladie de Takayasu par rapport aux sujets sains ou aux patients ayant une artérite à cellules géantes. Les données sur les lymphocytes B dans la maladie de Takayasu sont peu nombreuses. Une étude récente suggérait l'implication des lymphocytes B dans la pathogénie de la maladie de Takayasu du fait d'anomalies du phénotype lymphocytaire B et l'augmentation des plasmocytes¹⁹⁸. L'implication des lymphocytes B dans des structures lymphoïdes tertiaires revêt une importance particulière car elle suggère la présence d'auto-anticorps. La coopération entre les lymphocytes B et T au sein des structures lymphoïdes induit l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'Ig via les interactions CD40-CD40L, ICOS-ICOSL et CD28-CD80/86. BAFF, largement sécrété par les lymphocytes Tfh, pourrait également participer à la sélection positive de clones lymphocytaires B auto-réactifs¹⁹⁴. Ces auto-anticorps pourraient être pathogènes et participer à la pérennisation du processus inflammatoire. Ils pourraient aussi avoir une valeur diagnostique et/ou pronostique. Or de tels marqueurs font particulièrement défaut dans la maladie de Takayasu où l'activité de la maladie peut être difficile à évaluer. Beaucoup d'études ont tenté de mettre en évidence la présence d'auto-anticorps dans la maladie de Takayasu (antiphospholipides, anti-cellules endothéliales, anti-ferritine). Certaines études ont retrouvé une prévalence accrue d'anticorps anti-cellules endothéliales chez les patients ayant une maladie de Takayasu par rapport aux témoins. Toutefois, la spécificité de ces auto-anticorps était faible car ils ont également été retrouvés dans d'autres maladies autoimmunes ou vascularites^{200,208}. Une étude a montré que les sérums contenant de tels anticorps étaient capables d'induire une activation endothéliale via l'augmentation d'expression de VCAM, E-Selectine et la sécrétion d'IL-8 ou d'IL-6²⁰⁸. Les IgM dirigées contre les cellules endothéliales seraient également corrélées à l'activité de la maladie²⁰². L'ensemble de ces données suggère que les anticorps dirigés contre les cellules

endothéliales, bien que non spécifiques de la maladie de Takayasu et d'apparition probablement secondaire dans l'histoire de la maladie, pourraient par l'activation endothéliale entretenir la réponse inflammatoire et aggraver les dommages tissulaires.

Dans l'artérite à cellules géantes, quelques études se sont intéressées au rôle des lymphocytes B. Certaines ont retrouvé des données similaires aux nôtres, en rapportant une diminution des lymphocytes B circulants chez les patients ayant une artérite à cellules géantes active. Le nombre des lymphocytes B se normalisait rapidement sous traitement. Le nombre de lymphocytes B au niveau des lésions inflammatoires des artères temporales était faible. De ce fait, un « *trapping* » des lymphocytes B au niveau des sites inflammatoires paraît peu probable pour expliquer la diminution des cellules B périphériques, qui pourrait être plus volontiers liée à des anomalies de distribution des lymphocytes B à la phase active de l'artérite à cellules géantes¹⁴⁵.

Au plan thérapeutique, l'implication des lymphocytes B dans la maladie de Takayasu pourrait faire discuter l'intérêt du rituximab dans cette maladie. Les données sur l'efficacité du rituximab dans la maladie de Takayasu sont rares, même si quelques publications rapportent l'intérêt du rituximab dans certaines formes réfractaires¹⁹⁸. Enfin, l'efficacité des anti-IL6, dans certaines formes sévères ou réfractaires de la maladie de Takayasu, pourrait en partie être liée à l'inhibition de la différenciation Tfh et de la coopération lymphocytaire B et T en plus des modes d'action bien connus des anti-IL6 (inhibition de la polarisation Th17).

2- IL-33, cytokine complexe à l'interface des différentes facettes physiopathologiques des vascularites : de la régulation de la réponse immune au contrôle de l'angiogenèse et de la réparation tissulaire

2a-Régulation de la réponse immune :

L'IL-33, est initialement connue pour promouvoir une polarisation Th2. Les lymphocytes Th2, les ILC2, les mastocytes et les éosinophiles expriment de manière constitutive un taux élevé de ST2 (le récepteur à l'IL-33) à leur surface. Le facteur de transcription GATA3, exprimé dans les Th2, induit une expression stable et élevée de ST2. Il existe en retour un phénomène d'auto-amplification puisque l'IL-33, en se liant à son récepteur, en association avec IL-2/STAT-5, aboutit à une augmentation d'expression de GATA3 et donc à une augmentation de ST2⁴⁰. Le rôle majeur de l'IL-33 est désormais bien démontré dans l'allergie où cette cytokine favorise une réponse Th2 et une activation des ILC2 (produisant l'IL-5 et l'IL-13), éosinophiles et mastocytes^{42,46}.

Il a été montré plus récemment que les T régulateurs exprimant GATA3 expriment eux aussi de manière constitutive de hauts niveaux de ST2. L'IL-33 en association avec le TGF- β , favorise la différenciation en lymphocytes T régulateurs, via la phosphorylation de GATA-3 qui aboutit à l'expression de FOXP3 et de ST2. Une étude récente a montré, dans un modèle murin d'inflammation colique, une expression de ST2 par les lymphocytes T régulateurs¹⁶⁷. L'IL-33 favorisait la différenciation, la prolifération des T-régulateurs et leur maintien au niveau des sites inflammatoires. Biton et al., dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde (arthrite induite par le collagène), ont publié des résultats similaires⁵¹. L'administration d'IL-33 permettait de prévenir le développement de polyarthrites et était associée à une augmentation des lymphocytes T régulateurs et Th2. Dans la sclérose en

plaques, l'IL-33/ST2 augmentait la fréquence des Tregs et diminuait la production d'IL-17 et d'IFN γ ^{209,210}.

Dans notre étude, nous confirmons dans les vascularites des gros vaisseaux le rôle immunorégulateur de l'IL-33. Nous avons retrouvé que l'IL-33 était associée *in vitro* à une augmentation des lymphocytes T régulateurs par un effet direct de l'IL-33 sur les T régulateurs mais aussi via les mastocytes. Ceci pourrait être expliqué par une augmentation de sécrétion d'IL-2 induite par les mastocytes stimulés par l'IL-33 et une augmentation de l'activité IDO des mastocytes. L'augmentation de l'activité IDO représente un mécanisme immunorégulateur majeur car la dégradation des tryptophanes en kynurénines induit une diminution de la prolifération lymphocytaire T et NK, d'une part, et l'apoptose des lymphocytes Th1, d'autre part²¹¹. Au niveau des aortes inflammatoires de patients ayant une artérite à cellules géantes, l'expression relative de l'ARNm de l'IL-33 était positivement corrélée à celles de l'IL-10 et du TGF- β , suggérant également le rôle immunorégulateur de l'IL-33. Enfin, la présence d'IL-33 dans les milieux de cultures *ex-vivo* d'artères temporales était associée à une augmentation d'IL-10 au niveau transcriptionnel et au niveau protéique. Ces données sont cohérentes avec certains résultats de la littérature^{46,212}. Matta et al. ont également montré que l'IL-33, via la sécrétion d'IL-2 par les cellules dendritiques, favorisait l'expansion des lymphocytes T régulateurs²¹².

Cependant, le rôle de l'IL-33 semble plus complexe. Il a été récemment montré que les lymphocytes Th1 activés pouvaient également exprimer transitoirement le ST2, mais à des niveaux moindres que les lymphocytes T régulateurs et Th2²¹³. Les lymphocytes T CD8+ peuvent aussi exprimer de faibles niveaux de ST2. Les lymphocytes Th1 déficients en ST2 exprimeraient des taux plus faibles de T-BET et d'IFN γ , suggérant que l'IL-33 favorise directement ou indirectement l'expression de T-BET et d'IFN γ . Inversement, T-BET et STAT-4 sont nécessaires à l'expression de ST2 dans les lymphocytes Th1. Ces données

pourraient expliquer les résultats divergents, et à première vue contradictoires, de ceux exposés précédemment. Dans un modèle murin de lympho-histiocytose familiale (souris déficiente en perforine) infecté par le virus LCMV, l'inhibition de ST2 améliorait la survie et atténuait la gravité de la maladie. L'inhibition de ST2 était associée à une diminution significative des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques du LCMV et une diminution significative des taux d'IFN γ . Cette étude montre que, dans un modèle de maladie caractérisée par des réponses lymphocytaires Th1 et CD8⁺ cytotoxique, excessives et incontrôlées, l'IL-33 aurait un rôle délétère²¹⁴.

Dans notre étude également, nous mettons en évidence le rôle ambivalent et complexe de l'IL-33 dans la régulation de la réponse immune. Si l'IL-33 était associée à une réponse régulatrice en favorisant l'expansion des lymphocytes T régulateurs et en induisant une réponse Th2, la présence d'IL-33 était également associée à une augmentation non significative de la sécrétion d'IFN γ par les PBMC de patients ayant une vascularite active. Cette augmentation était moindre que l'augmentation des cytokines Th2. Ces données soulignent les effets ambivalents de l'IL-33, qui peut avoir des effets divergents en fonction de la pathologie, des conditions expérimentales, du moment de l'administration, de l'environnement cytokinique et probablement de la dose d'IL-33 utilisée. L'exemple de la réaction du greffon contre l'hôte peut illustrer ce point. Les injections d'IL-33 au pic de la réponse inflammatoire aboutissaient à une augmentation de la mortalité liée à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires²¹⁵. L'administration d'IL-33 en pré-conditionnement était associée à une augmentation des Treg et à une diminution de la sévérité de la maladie. Le transfert adoptif de Treg ST2⁺ conférait une protection vis-à-vis de la maladie, ce qui n'était pas le cas en présence de Treg ST2⁻²¹⁶. Les effets de l'IL-33 semblent donc très différents en fonction du moment de son administration. Les observations dans les modèles murins de colite inflammatoires fournissent des informations similaires²¹⁷.

En conclusion, il semble vraisemblable que l'IL-33, véritable signal de danger (sécrété en cas de nécrose tissulaire), ait en premier lieu un rôle immunorégulateur et pro-Th2. Cependant, dans des conditions particulières (forte sécrétion d'IL-33 et/ou prépondérance majeure de lymphocytes Th1), l'IL-33 pourrait aussi favoriser transitoirement une réponse Th1. Certaines combinaisons cytokiniques pourraient favoriser une réponse régulatrice alors que d'autres favoriseraient une réponse effectrice. C'est un point que nous étudierons dans des études à venir.

2b-Mastocytes et IL-33 dans la régulation de la réponse immune :

L'axe IL-33/ST2 favorise la maturation, l'activation et la survie mastocytaire. Le rôle pro-inflammatoire de l'IL-33, via la stimulation des mastocytes par liaison au récepteur ST2, est bien connu dans l'allergie. De nombreuses d'études ont démontré le rôle majeur de l'IL-33 dans des modèles murins d'allergie, dans la mise en place de la réponse inflammatoire et l'hyper-éosinophilie bronchique ⁴⁶ via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α). Dans notre étude, nous montrons que ces effets pro-inflammatoires sont contrebalancés par un versant immunorégulateur des mastocytes en présence d'IL-33. Dans les vascularites des gros vaisseaux, nous avons montré que les mastocytes stimulés par l'IL-33 induisaient une augmentation des lymphocytes T régulateurs. L'augmentation de l'activité IDO et de l'IL-2 dans les cultures de mastocytes stimulés par l'IL-33 pourrait expliquer en partie l'augmentation des lymphocytes T régulateurs observée dans les co-cultures comprenant des mastocytes stimulés par l'IL-33. Nos données sont cohérentes avec celles d'autres études récentes démontrant le rôle régulateur des mastocytes. Morita et al. ont démontré, dans un modèle murin d'allergie à la papaïne, que les mastocytes et l'IL-33 étaient indispensables pour la mise en place d'une réponse T régulatrice⁴⁶. L'IL-33, favorisait l'hyper-éosinophilie et la réaction inflammatoire des voies aériennes, mais induisait, dans le

même temps, une augmentation des T régulateurs via l'IL-2⁴⁶. Une autre étude récente sur la polyarthrite rhumatoïde a montré que l'IL-33 en association à des IgG aboutissait à la sécrétion d'IL-10, inhibant l'activation mastocytaire. L'expression relative des gènes spécifiques des mastocytes dans les biopsies synoviales était inversement corrélée à la sévérité de la maladie alors que celle de l'IL-33 était, quant à elle, inversement corrélée à celles de marqueurs pro-inflammatoires (TNF α)⁷³. Les mastocytes se sont avérés essentiels dans l'induction d'une tolérance après greffe cutanée chez la souris via l'IL-9, qui est sécrétée par les T régulateurs, et qui active et recrute les mastocytes¹⁶⁹. Le rôle protecteur des mastocytes via l'IL-10 a été mis en évidence dans les dermites de contact ou post irradiation²¹⁸. D'autres études ont montré que les cellules dendritiques, en présence de mastocytes, avaient un profil régulateur via l'expression de niveaux élevés de PDL-1 et la sécrétion d'IDO permettant l'activation des T régulateurs et par conséquent la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β ¹⁷⁰.

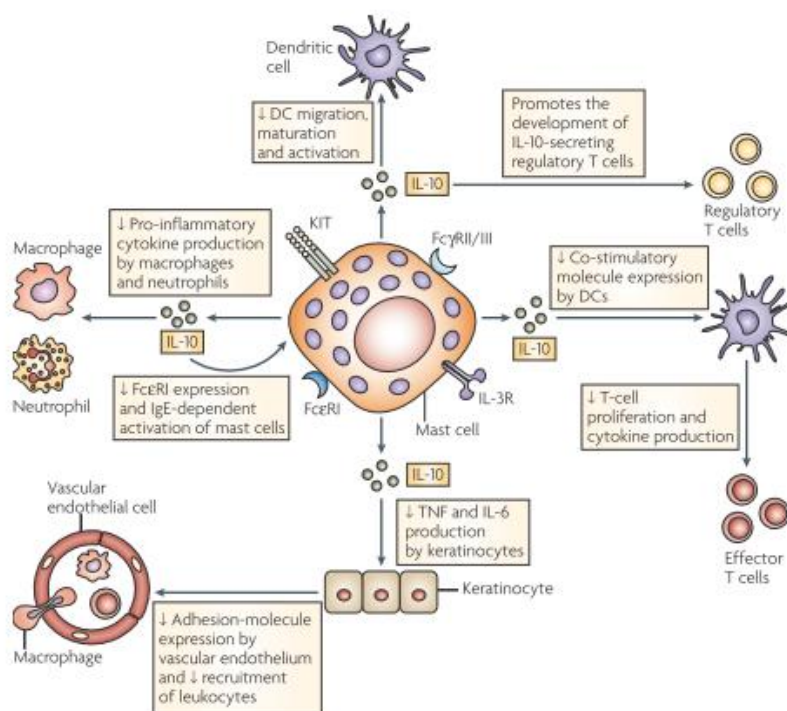


Figure : Rôle immunomodulateur des mastocytes dépendant de l'IL-10²¹⁹

2c-Rôle pro-angiogénique de l'Interleukine 33 et des mastocytes:

L'ensemble de nos données montrent que l'IL-33 est fortement associée à une augmentation de l'angiogenèse, de la perméabilité vasculaire et de l'activation endothéliale. Certaines études ont montré que l'IL-33 induisait *in vitro* en contexte physiologique, une augmentation de la migration endothéliale, de la prolifération endothéliale et la formation de « tubes endothéliaux »⁴³. Il a été également démontré que l'IL-33 favorisait la perméabilité vasculaire dans des modèles non inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. La stimulation des cellules endothéliales par l'IL-33 était associée à une augmentation de l'activation endothéliale et notamment une surexpression d'intégrines, permettant aux cellules inflammatoires d'être recrutées au niveau du site pathologique⁴⁴.

Dans notre étude, nous avons retrouvé que la néo-angiogenèse, l'activation endothéliale et l'augmentation de la perméabilité vasculaire mises en évidence dans les vascularites des gros vaisseaux, étaient en partie médiées par l'IL-33. *In vitro*, la présence d'IL-33 était associée à une augmentation de l'expression de l'intégrine ICAM-1 par les cellules endothéliales stimulées par le sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux. Inversement, l'inhibition de l'IL-33 était associée à une diminution d'expression d'ICAM-1. L'IL-33 induisait, toujours dans un contexte inflammatoire, une augmentation de la prolifération endothéliale, de la formation de « tubes endothéliaux » et de la migration endothéliale. L'augmentation *in vivo* de la perméabilité vasculaire (par mesure de l'extravasation vasculaire) induite par l'injection de sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux était partiellement inhibée par l'adjonction d'un anticorps neutralisant l'IL-33. Nous avons également montré que ces effets étaient abolis chez les souris déficientes en mastocytes, suggérant que l'augmentation *in vivo* de la perméabilité vasculaire par l'IL-33 était dépendante des mastocytes. Nous avons montré que la stimulation des mastocytes par l'IL-33 aboutissait à une augmentation de sécrétion d'histamine, molécule vasodilatatrice.

L'augmentation de perméabilité vasculaire *in vivo* induite par l'axe IL-33/mastocyte est donc vraisemblablement partiellement médiée par l'histamine.

Toutes nos données confirment le rôle majeur de l'IL-33 comme facteur pro-angiogénique et activateur endothélial, et ce, même en contexte inflammatoire. Si l'activation endothéliale, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la formation de néo-vaisseaux sont probablement associées à un afflux de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel et donc à la pérennisation de la réponse inflammatoire, de tels phénomènes sont également associés à des mécanismes de réparation tissulaire et de « cicatrisation »¹⁶⁶. Une étude très récente a permis de faire le lien direct entre activation endothéliale et différenciation lymphocytaire. En effet, il a été ainsi démontré que l'activation endothéliale induite par le VEGF aboutissait à l'expression endothéliale du ligand de Notch (Jagged 1). L'interaction de *Jagged 1* avec son récepteur exprimé sur les lymphocytes T CD4+, conduisait à leur différenciation en Th1 et Th17²²⁰.

2d-IL-33, mastocytes et remodelage tissulaire :

L'IL-33 est associée aux processus de néo-angiogenèse et à une réponse immune Th2 qui sont connus pour être associés aux phénomènes de réparation tissulaire, voire au développement de lésions fibrosantes¹⁸⁵. L'inhibition de l'axe IL-33/ST2 dans un modèle murin d'infection pulmonaire liée au virus de la grippe, se traduisait par une fréquence diminuée d'ILC2, une fonction pulmonaire amoindrie par perte de l'intégrité épithéliale des voies respiratoires et un remodelage tissulaire altéré²²¹. Les ILC2 en présence d'IL-33 étaient associés dans une autre étude à une meilleure cicatrisation cutanée¹⁰¹. Les ILC2 et l'IL-33 pourraient conduire à des phénomènes de réparation tissulaire excessifs et aboutir *in fine* au développement de lésions de fibrose. Sur ce point, les données des différentes études peuvent paraître contradictoires en

fonction du modèle et de l'organe concerné. Au niveau cardiaque, Seki et al. ont montré après ischémie myocardique, une diminution de la zone infarctée et de la fibrose cardiaque chez les souris ayant reçu de l'IL-33¹⁸². Dans un modèle murin de cardiopathie liée à une surcharge de pression, les souris KO pour ST2 avaient une hypertrophie et une fibrose cardiaque significativement plus importante¹⁰⁵ alors que l'IL-33 protégeait au contraire les souris WT contre la survenue de telles lésions. La survie des souris WT traitées par IL-33 était améliorée par rapport aux souris WT témoins, alors que les souris *knock-out* (KO) pour le ST2 avaient une survie diminuée. A l'inverse, dans un modèle de fibrose hépatique d'origine chimique, les souris KO pour l'IL-33 présentaient une fibrose hépatique moins sévère. L'IL-33 était associée à une aggravation de la fibrose via les ILC2 et la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13¹⁸⁵.

Dans nos travaux, nous avons étudié l'impact de l'IL-33 sur les lésions de fibrose artérielle observée dans les vascularites des gros vaisseaux. Nous avons étudié l'impact de l'IL-33 sur la prolifération et la différenciation fibroblastiques. Nos données suggèrent que l'IL-33, par ses effets immunomodulateurs, pourrait être associée à des lésions de fibrose dans un contexte d'inflammation persistante. L'expression relative aortique de l'ARNm de l'IL-33 était associée à celles de cytokines profibrosantes comme le PDGF- α et le PDGF- β . L'IL-33 induisait une sécrétion de PDGF- α par les monocytes de patients. L'IL-33 était associée à une réponse Th2 directement corrélée aux lésions histologiques de fibrose (via l'IL-13). En revanche, nous n'avons pas retrouvé d'effet direct de l'IL-33 sur la prolifération *in vitro* des fibroblastes artériels et la production de fibronectine et de collagène de type 1A, c'est-à-dire les protéines de la matrice extracellulaire constituant les lésions de fibrose. Nous avons mis en évidence un rôle direct des mastocytes activés par le sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux sur la différenciation fibroblastique. La présence de surnageants de mastocytes dans le milieu de culture des fibroblastes induisait une augmentation de production de collagène et de fibronectine, par rapport aux fibroblastes non stimulés ou

stimulés par des surnageants de mastocytes cultivés en présence de sérum de sujets sains. La stimulation des mastocytes par l'IL-33 n'avait pas d'effet sur la sécrétion de collagène et de fibronectine ou l'expression d' α SMA.

L'ensemble de ces données montre un effet profibrosant des mastocytes activés par du sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux. L'IL-33, dans un contexte d'inflammation chronique non contrôlée, pourrait avoir un rôle profibrosant indirect via ses effets immunomodulateurs plutôt que par un effet direct sur les fibroblastes.

3-Conclusions et perspectives :

IL-33 et mastocytes, à l'interface de multiples processus pathologiques immunologiques, vasculaires et de réparation tissulaire

Conclusions :

Nos données et celles de la littérature plaident pour un rôle pro-Th2 et immunorégulateur de l'IL-33, par une action directe sur les Treg, d'une part, et par l'action immunorégulatrice des mastocytes via la sécrétion d'IL-2 activant les Treg et la sécrétion d'IDO, d'autre part. L'IL-33 et les mastocytes, via la sécrétion d'histamine, augmentent la perméabilité vasculaire et ont une action pro-angiogénique, deux phénomènes qui peuvent s'avérer délétères dans ce contexte par recrutement de cellules inflammatoires. Enfin, l'axe IL-33/mastocytes, via ses actions pro-Th2, immunorégulatrice, et néo-angiogénique, est associé à des mécanismes de réparation tissulaire. Ces phénomènes peuvent s'avérer délétères en cas d'inflammation persistante, induisant le développement de lésions de fibrose. Si l'IL-33 ne semble pas être directement responsable d'une activation/prolifération fibroblastique au niveau artériel en contexte inflammatoire, les mastocytes activés par du sérum de patients ayant une vascularite des gros vaisseaux conduisent à des modifications du phénotype fibroblastique en induisant une augmentation de production de collagène de type 1 et de fibronectine.

Nos résultats permettent ainsi d'établir un lien jusqu'ici mal connu, entre lésion tissulaire, régulation de la réponse immune et de la réponse endothéliale et mécanismes de réparation tissulaire dans les maladies vasculaires inflammatoires des gros vaisseaux. Les différents effets de l'IL-33 et des mastocytes sont illustrés dans les **figures n°27 et 28** (adaptation de figures des revues).

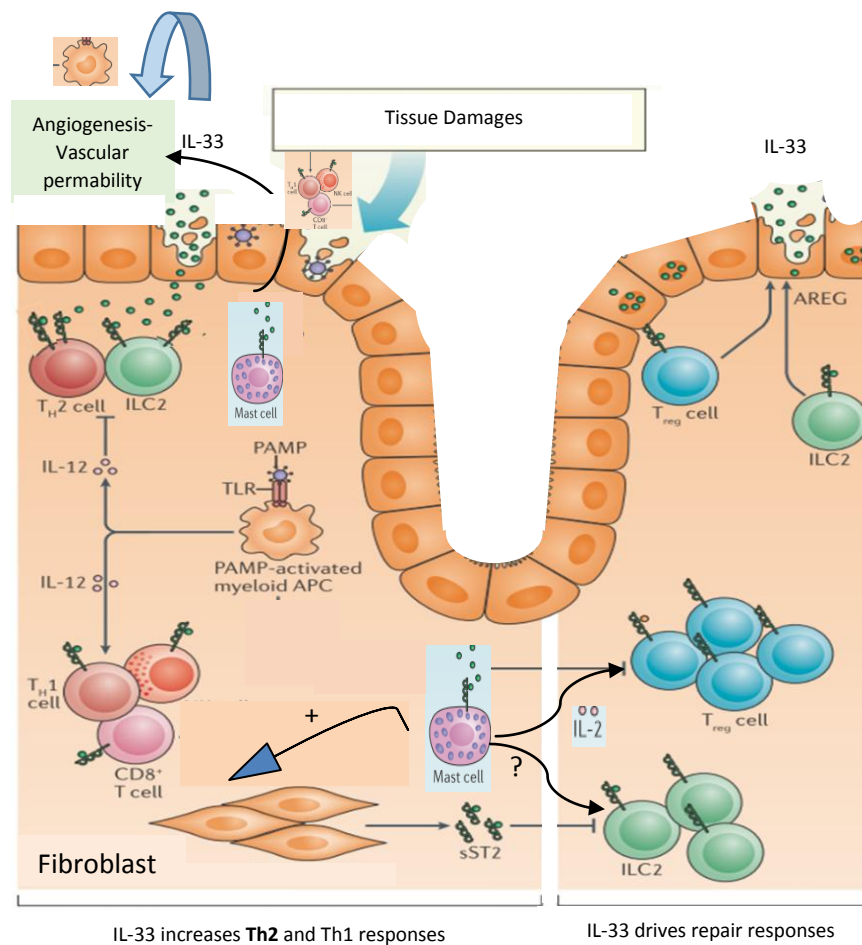


Figure n°27: Adaptation d'un schéma représentant les effets de l'IL-33 et des mastocytes sur la réponse inflammatoire et les mécanismes de réparation tissulaire au voisinage d'un vaisseau³⁹

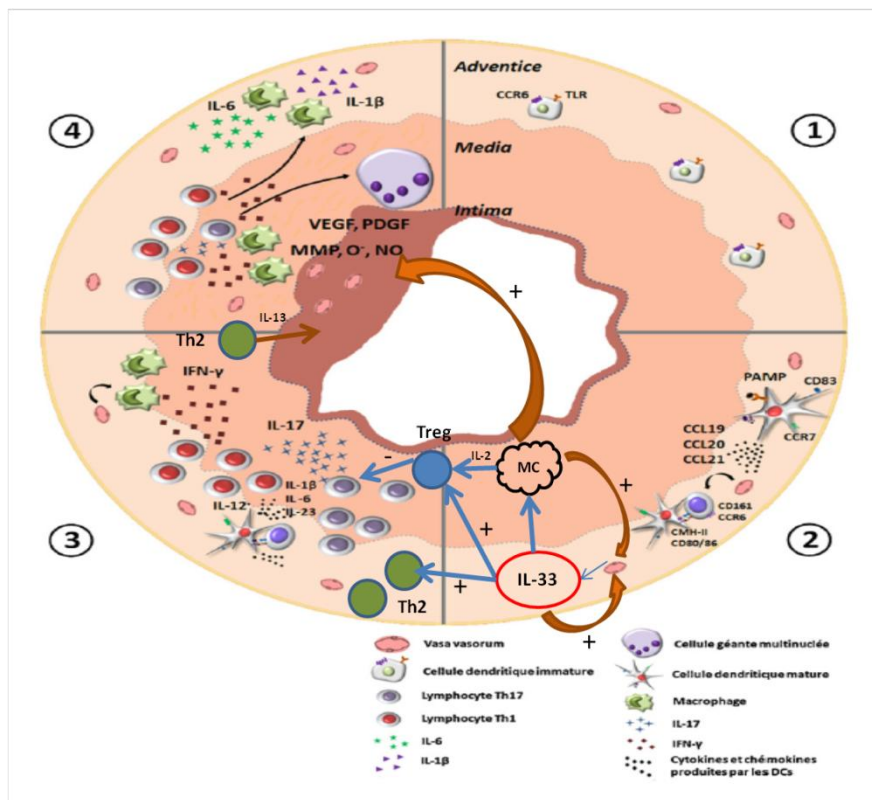


Figure n°28: Adaptation d'un schéma représentant les effets de l'IL-33 et des mastocytes sur la réponse inflammatoire au sein d'une artère dans un modèle de vascularite des gros vaisseaux²²²

Questions non résolues et perspectives :

Plusieurs questions restent en suspens. Etant donnée la complexité d'action de l'IL-33 sur les réponses Th1, Th2, Th17 et régulatrice et les mécanismes de réparation tissulaire, en fonction de l'environnement cytokinique, cellulaire et des multiples systèmes de régulation de son action *in vivo*, il est indispensable d'étudier ses effets *in vivo* dans un modèle murin de vascularite des gros vaisseaux. Pour ce faire, il conviendrait d'utiliser un modèle murin de vascularite des gros vaisseaux (greffe d'artère inflammatoire), utilisant des souris SCID croisées avec des souris déficientes en mastocytes ou non et dans lesquelles seraient transférés des lymphocytes déficients ou non en ST2. Ces modèles nous permettraient d'étudier l'impact

in vivo de l'axe IL-33/ST2 sur la régulation de la réponse immune et le développement de fibrose artérielle dans un contexte d'inflammation vasculaire persistante. On pourrait ainsi déterminer les effets dépendants des mastocytes ou non et étudier l'effet de l'administration d'IL-33. Comme évoqué dans l'introduction et la discussion, les résultats obtenus sur les modèles murins de polyarthrite rhumatoïde et de réaction du greffon contre l'hôte sont très différents en fonction du moment de l'induction du déficit en mastocytes, de la dose administrée d'IL-33 et du modèle murin utilisé. Ce seront autant de points à étudier dans les expérimentations *in vivo*.

Nous n'avons pas étudié l'effet de l'IL-33 et des mastocytes sur un autre aspect du remodelage vasculaire, à savoir le développement de lésions anévrysmales. Des expérimentations sont en cours : étude des corrélations de l'expression aortique des ARNm de l'IL-33, des gènes spécifiques des mastocytes et des métalloprotéases. Nous débutons également une collaboration afin d'étudier l'impact de l'IL-33 et des mastocytes sur les phénomènes d'angiogenèse et de réparation tissulaire via les cellules musculaires lisses.

Enfin, ces données mettent en avant le lien très étroit entre une réponse immune Th1/Th17 inadaptée, un défaut de réponse régulatrice, des processus de néo-angiogenèse favorisant la persistance de la réponse inflammatoire, et *in fine* un remodelage tissulaire inadapté. Le remodelage tissulaire est lié à des destructions tissulaires relatives à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6 et cytokines Th1 induisant la sécrétion de métalloprotéases), et de mécanismes chroniques de réparation via la réponse régulatrice (cytokines Th2, ILC2, TGF- β). Ces observations posent la question de l'intérêt de détecter ces vascularites des gros vaisseaux, et leur activité, de manière plus précoce. Le diagnostic de ces maladies, sans marqueur spécifique, repose sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques. Ceci peut poser de difficiles problèmes en pratique clinique, notamment en l'absence de syndrome inflammatoire et/ou de signe scannographique alors

qu'il existe des signes de vascularite au TEP-TDM par exemple. Il paraît donc important d'améliorer les méthodes de dépistage avec l'aide de biomarqueurs plus sensibles. Ces biomarqueurs pourraient également être utiles pour apprécier l'efficacité des traitements immunosuppresseurs administrés et l'activité de la maladie. Une étude récente, portant sur le suivi anatomopathologique d'artères temporales de patients ayant une artérite à cellules géantes traitée par corticoïdes, a montré que 4 des 9 patients avaient encore des lésions histologiques actives de vascularite à 12 mois²²³. La survenue de lésions anévrysmales, notamment aortiques, de nombreuses années après le diagnostic chez certains patients ayant une artérite à cellules géantes peut également questionner sur l'existence d'un processus inflammatoire *a minima* persistant, engendrant des phénomènes persistants de remodelage vasculaire et *in fine* une dilatation artérielle. Tout ceci incite à rechercher des moyens plus fiables et plus sensibles, d'évaluation de l'activité de la vascularite.

Lymphocytes Tfh et vascularites

Nous avons mis en évidence une augmentation des lymphocytes Tfh circulants associée à une augmentation des lymphocytes B circulants et à la présence d'organes lymphoïdes ectopiques aortiques dans la maladie de Takayasu. Nous avons montré un lien étroit entre IL-21 et lymphocytes Th17 qui suggère une stimulation réciproque des Tfh et des Th17. Nos résultats suggèrent donc l'implication d'une coopération lymphocytaire B et T centrale et d'une stimulation antigénique dans la physiopathologie de la maladie de Takayasu.

La population Tfh dans le sang pourrait être le témoin périphérique de la réponse immune intravasculaire et devenir un outil précieux pour l'étude plus précise de la réaction immune locale vasculaire. Par l'analyse conjointe du répertoire des Tfh circulants et des Tfh triés à partir d'artères pathologiques de patients ayant une maladie de Takayasu, nous pourrions comparer le répertoire TCR et déterminer si la population circulante est bien le témoin de la

réponse immune locale. L'existence d'une restriction de répertoire de cette population Tfh étayerait la thèse de la stimulation antigénique. Si nous confirmons la spécificité antigénique des Tfh circulants dans la maladie de Takayasu, la population périphérique CD4⁺ CXCR5⁺ dans la maladie de Takayasu constituerait une population lymphocytaire spécifique facilement accessible, qui pourrait permettre de déterminer l'autoantigène reconnu. Ceci nous inciterait à rechercher dans cette maladie des auto-anticorps spécifiques, qui seraient d'éventuels futurs marqueurs diagnostiques et/ou pronostiques. Des expérimentations sont en cours pour répondre à la question de la spécificité antigénique des Tfh circulants et artériels.

Au plan thérapeutique, l'implication des Tfh et le déséquilibre de la réponse immune en faveur d'une réponse Th1/Th17, nous incitent à cibler l'IL-12 et l'IL-23 impliqués à la fois dans la différenciation Th/Th17 et Tfh. L'ustekinumab a été rapporté efficace chez certains patients réfractaires ayant une artérite à cellules géantes et s'accompagnait d'une diminution de production de cytokines Th1 et Th17²²⁴. L'ustekinumab, particulièrement efficace dans le psoriasis, mériterait donc d'être évalué dans la maladie de Takayasu.

E-Bibliographie

1. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly — TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:412–26.
2. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL-23–IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:585–600.
3. Mease PJ. Inhibition of interleukin-17, interleukin-23 and the TH17 cell pathway in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. *Curr Opin Rheumatol*. 2015;27:127–33.
4. Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:295–307.
5. Ciccia F, Guggino G, Ferrante A, Cipriani P, Giacomelli R, Triolo G. Interleukin-9 and T helper type 9 cells in rheumatic diseases: IL-9 in rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol*. 2016;185:125–32.
6. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:365–79.
7. Mirshafiey A, Simhag A, El Rouby NMM, Azizi G. T-helper 22 cells as a new player in chronic inflammatory skin disorders. *Int J Dermatol*. 2015;54:880–8.
8. Ueno H. Human Circulating T Follicular Helper Cell Subsets in Health and Disease. *J Clin Immunol*. 2016;36 Suppl 1:34–9.
9. Schmitt N, Bustamante J, Bourdery L, Bentebibel SE, Boisson-Dupuis S, Hamlin F, et al. IL-12 receptor β 1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. *Blood*. 2013;121:3375–85.
10. Schmitt N, Liu Y, Bentebibel S-E, Munagala I, Bourdery L, Venuprasad K, et al. The cytokine TGF- β co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol*. 2014;15:856–65.
11. Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34:108–21.
12. Schmitt N, Bentebibel S-E, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol*. 2014;35:436–42.
13. Ueno H, Banchereau J, Vinuesa CG. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat Immunol*. 2015;16:142–52.
14. Luo C, Li Y, Liu W, Feng H, Wang H, Huang X, et al. Expansion of circulating counterparts of follicular helper T cells in patients with myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*. 2013;256:55–61.

15. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62:234–44.
16. Wang J, Shan Y, Jiang Z, Feng J, Li C, Ma L, et al. High frequencies of activated B cells and T follicular helper cells are correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2013;174:212–20.
17. Le Coz C, Joublin A, Pasquali J-L, Korganow A-S, Dumortier H, Monneaux F. Circulating TFH subset distribution is strongly affected in lupus patients with an active disease. *PloS One*. 2013;8:e75319.
18. Pallikkuth S, Pilakka Kanthikeel S, Silva SY, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186:6173–81.
19. Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, George VK, Fischl M, Pahwa R, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood*. 2012;120:985–93.
20. Linterman MA, Hill DL. Can follicular helper T cells be targeted to improve vaccine efficacy? *F1000Research*. 2016;5.
21. Lindqvist M, van Lunzen J, Soghoian DZ, Kuhl BD, Ranasinghe S, Kranias G, et al. Expansion of HIV-specific T follicular helper cells in chronic HIV infection. *J Clin Invest*. 2012;122:3271–80.
22. Petrovas C, Yamamoto T, Gerner MY, Boswell KL, Wloka K, Smith EC, et al. CD4 T follicular helper cell dynamics during SIV infection. *J Clin Invest*. 2012;122:3281–94.
23. Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, et al. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*. 2007;8:931–41.
24. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010;184:3433–41.
25. Himmel ME, MacDonald KG, Garcia RV, Steiner TS, Levings MK. Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;190:2001–8.
26. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 2]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri.2017.75>
27. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009;30:899–911.
28. Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 2]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri.2017.75>

29. Kim H-J, Barnitz RA, Kreslavsky T, Brown FD, Moffett H, Lemieux ME, et al. Stable inhibitory activity of regulatory T cells requires the transcription factor Helios. *Science*. 2015;350:334–9.
30. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, et al. GATA3 controls Foxp3⁺ regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:4503–15.
31. Wang Y, Su MA, Wan YY. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity*. 2011;35:337–48.
32. Charbonnier L-M, Wang S, Georgiev P, Sefik E, Chatila TA. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell-intrinsic Notch signaling. *Nat Immunol*. 2015;16:1162–73.
33. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*. 2014;20:62–8.
34. Levine AG, Medoza A, Hemmers S, Moltedo B, Niec RE, Schizas M, et al. Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. *Nature*. 2017;546:421–5.
35. Minton K. Regulatory T cells: Subset-specific suppression. *Nat Rev Immunol*. 2017;17:401.
36. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:295–307.
37. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. 2013;39:1003–18.
38. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity*. 2013;39:1003–18.
39. Liew FY, Girard J-P, Turnquist HR. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2016;16:676–689.
40. Peine M, Marek RM, Löhning M. IL-33 in T Cell Differentiation, Function, and Immune Homeostasis. *Trends Immunol*. 2016;37:321–33.
41. Griesenauer B, Paczesny S. The ST2/iL-33 Axis in immune Cells during inflammatory Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 25];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5402045/>
42. Cayrol C, Girard J-P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol*. 2014;31:31–7.
43. Choi Y-S, Choi H-J, Min J-K, Pyun B-J, Maeng Y-S, Park H, et al. Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood*. 2009;114:3117–3126.
44. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, Kaun C, Rauscher S, Niessner A, et al. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31:2080–2089.
45. Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41:245–53.

46. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. *Immunity*. 2015;43:175–86.
47. Saluja R, Khan M, Church MK, Maurer M. The role of IL-33 and mast cells in allergy and inflammation. *Clin Transl Allergy*. 2015;5:33.
48. Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 3];31. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,20591c2466aedc19,222bcdb718a38c7c.html>
49. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:738–49.
50. Xu D, Jiang H-R, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105:10913–10918.
51. Biton J, Khaleghparast Athari S, Thiolat A, Santinon F, Lemeiter D, Hervé R, et al. In Vivo Expansion of Activated Foxp3⁺ Regulatory T Cells and Establishment of a Type 2 Immune Response upon IL-33 Treatment Protect against Experimental Arthritis. *J Immunol*. 2016;197:1708–19.
52. Okayama Y, Kawakami T. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res*. 2006;34:97–115.
53. Tkaczyk C, Horejsi V, Iwaki S, Draber P, Samelson LE, Satterthwaite AB, et al. NTAL phosphorylation is a pivotal link between the signaling cascades leading to human mast cell degranulation following Kit activation and Fc epsilon RI aggregation. *Blood*. 2004;104:207–14.
54. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;179:2051–4.
55. Iikura M, Suto H, Kajiwarra N, Oboki K, Ohno T, Okayama Y, et al. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2007;87:971–8.
56. Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwarra N, Suto H, Iikura M, et al. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-Fc epsilon RI signals. *J Leukoc Biol*. 2007;82:1481–90.
57. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol*. 2011;41:760–72.
58. Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9773–8.
59. Jang TY, Kim YH. Interleukin-33 and mast cells bridge innate and adaptive immunity: from the allergologist's perspective. *Int Neurourol J*. 2015;19:142.
60. Fong DC, Malbec O, Arock M, Cambier JC, Fridman WH, Daëron M. Selective in vivo recruitment of the phosphatidylinositol phosphatase SHIP by phosphorylated Fc gammaRIIB

- during negative regulation of IgE-dependent mouse mast cell activation. *Immunol Lett.* 1996;54:83–91.
61. Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 3];31. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,20591c2466aedc19,222bcdb718a38c7c.html>
 62. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Aug 3]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/18182576>
 63. Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Aug 3];31. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,20591c2466aedc19,222bcdb718a38c7c.html>
 64. Kalesnikoff J, Galli SJ. Anaphylaxis: mechanisms of mast cell activation. *Chem Immunol Allergy.* 2010;95:45–66.
 65. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:93–104.
 66. Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for IgE antibodies in immune homeostasis and allergic diseases. *Immunol Rev.* 2011;242:128–43.
 67. Rivellese F, Nerviani A, Rossi FW, Marone G, Matucci-Cerinic M, de Paulis A, et al. Mast cells in rheumatoid arthritis: friends or foes? *Autoimmun Rev.* 2017;16:557–63.
 68. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 2002;297:1689–92.
 69. van der Velden D, Lagraauw HM, Wezel A, Launay P, Kuiper J, Huizinga TWJ, et al. Mast cell depletion in the preclinical phase of collagen-induced arthritis reduces clinical outcome by lowering the inflammatory cytokine profile. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016 [cited 2017 Aug 2];18. Available from: <http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-1036-8>
 70. Schubert N, Dudeck J, Liu P, Karutz A, Speier S, Maurer M, et al. Mast cell promotion of T cell-driven antigen-induced arthritis despite being dispensable for antibody-induced arthritis in which T cells are bypassed. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ.* 2015;67:903–13.
 71. Buckley MG, Walters C, Wong WM, Cawley MI, Ren S, Schwartz LB, et al. Mast cell activation in arthritis: detection of alpha- and beta-tryptase, histamine and eosinophil cationic protein in synovial fluid. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 1997;93:363–70.
 72. Sandler C, Lindstedt KA, Joutsiniemi S, Lappalainen J, Juutilainen T, Kolah J, et al. Selective activation of mast cells in rheumatoid synovial tissue results in production of TNF-alpha, IL-1beta and IL-1Ra. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2007;56:230–9.
 73. Rivellese F, Suurmond J, Habets K, Dorjée AL, Ramamoorthi N, Townsend MJ, et al. Ability of Interleukin-33- and Immune Complex-Triggered Activation of Human Mast Cells to Down-Regulate Monocyte-Mediated Immune Responses: MAST CELL SUPPRESSION OF MONOCYTE ACTIVATION. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67:2343–53.

74. Leveson-Gower DB, Segal EI, Kalesnikoff J, Florek M, Pan Y, Pierini A, et al. Mast cells suppress murine GVHD in a mechanism independent of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood*. 2013;122:3659–65.
75. Sunderkötter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther*. 1991;51:195–216.
76. Stamatovic SM, Keep RF, Mostarica-Stojkovic M, Andjelkovic AV. CCL2 regulates angiogenesis via activation of Ets-1 transcription factor. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006;177:2651–61.
77. Ehling J, Bartneck M, Wei X, Gremse F, Fech V, Möckel D, et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut*. 2014;63:1960–71.
78. Ridiandries A, Tan J, Bursill C. The Role of CC-Chemokines in the Regulation of Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1856.
79. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2411-2419.
80. Niiyama H, Kai H, Yamamoto T, Shimada T, Sasaki K-I, Murohara T, et al. Roles of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 in ischemia-induced neovascularization. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:661–6.
81. van Weel V, Toes REM, Seghers L, Deckers MML, de Vries MR, Eilers PH, et al. Natural killer cells and CD4+ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2310–8.
82. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*. 2003;108:205–10.
83. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, et al. CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation*. 2006;113:118–24.
84. Kneilling M, Hültner L, Pichler BJ, Mailhammer R, Morawietz L, Solomon S, et al. Targeted mast cell silencing protects against joint destruction and angiogenesis in experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2007;56:1806–16.
85. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C, et al. Regulatory T Cells Modulate Postischemic Neovascularization. *Circulation*. 2009;120:1415–25.
86. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*. 2000;87:448–52.
87. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*. 2011;475:226–30.
88. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:457–74.

89. De Palma M, Biziato D, Petrova TV. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2017;17:457–74.
90. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44:450–62.
91. Verma SK, Garikipati VNS, Krishnamurthy P, Schumacher-Bass SM, Grisanti LA, Cimini M, et al. Interleukin 10 Inhibits Bone Marrow Fibroblast Progenitor Cell-Mediated Cardiac Fibrosis in Pressure Overloaded Myocardium. *Circulation*. 2017;
92. Vannella KM, Wynn TA. Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:593–617.
93. Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration: Mescher. *Regeneration*. 2017;4:39–53.
94. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghow R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992;90:1479–85.
95. Wynn TA. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:583–94.
96. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;188:3573–83.
97. Brembilla NC, Montanari E, Truchetet M-E, Raschi E, Meroni P, Chizzolini C. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R151.
98. Truchetet M-E, Brembilla N-C, Montanari E, Lonati P, Raschi E, Zeni S, et al. Interleukin-17A+ cell counts are increased in systemic sclerosis skin and their number is inversely correlated with the extent of skin involvement. *Arthritis Rheum*. 2013;65:1347–56.
99. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y, et al. A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell*. 2013;155:1282–95.
100. Kuswanto W, Burzyn D, Panduro M, Wang KK, Jang YC, Wagers AJ, et al. Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity*. 2016;44:355–67.
101. Rak GD, Osborne LC, Siracusa MC, Kim BS, Wang K, Bayat A, et al. IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *J Invest Dermatol*. 2016;136:487–96.
102. Monticelli LA, Osborne LC, Noti M, Tran SV, Zaiss DMW, Artis D. IL-33 promotes an innate immune pathway of intestinal tissue protection dependent on amphiregulin-EGFR interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:10762–7.
103. Luzina IG, Kopach P, Lockett V, Kang PH, Nagarsekar A, Burke AP, et al. Interleukin-33 potentiates bleomycin-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;49:999–1008.

104. Li D, Guabiraba R, Besnard A-G, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, et al. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:1422–1432.e11.
105. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie ANJ, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest*. 2007;117:1538–49.
106. Lee JS, Seppanen E, Patel J, Rodero MP, Khosrotehrani K. ST2 receptor invalidation maintains wound inflammation, delays healing and increases fibrosis. *Exp Dermatol*. 2016;25:71–4.
107. Martínez-Martínez E, Miana M, Jurado-López R, Rousseau E, Rossignol P, Zannad F, et al. A Role for Soluble ST2 in Vascular Remodeling Associated with Obesity in Rats. Rouet P, editor. *PLoS ONE*. 2013;8:e79176.
108. Wilson NK, Gould RA, Gallo MacFarlane E, Consortium ML. Pathophysiology of aortic aneurysm: insights from human genetics and mouse models. *Pharmacogenomics*. 2016;17:2071–80.
109. Stone JR, Bruneval P, Angelini A, Bartoloni G, Basso C, Batoroeva L, et al. Consensus statement on surgical pathology of the aorta from the Society for Cardiovascular Pathology and the Association for European Cardiovascular Pathology: I. Inflammatory diseases. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol*. 2015;24:267–78.
110. Lindsay AC, Foale RA, Warren O, Henry JA. Cannabis as a precipitant of cardiovascular emergencies. *Int J Cardiol*. 2005;104:230–232.
111. Jones JA, Beck C, Barbour JR, Zavadzkas JA, Mukherjee R, Spinale FG, et al. Alterations in aortic cellular constituents during thoracic aortic aneurysm development: myofibroblast-mediated vascular remodeling. *Am J Pathol*. 2009;175:1746–56.
112. He R, Guo D-C, Estrera AL, Safi HJ, Huynh TT, Yin Z, et al. Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;131:671–8.
113. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T H 2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol*. 2002;161:499–506.
114. Galle C, Schandene L, Stordeur P, Peignois Y, Ferreira J, Wautrecht J-C, et al. Predominance of type 1 CD4+T cells in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Exp Immunol*. 2005;0:051006055454003.
115. Shimizu K, Shichiri M, Libby P, Lee RT, Mitchell RN. Th2-predominant inflammation and blockade of IFN- γ signaling induce aneurysms in allografted aortas. *J Clin Invest*. 2004;114:300–8.
116. Ait-Oufella H, Wang Y, Herbin O, Bourcier S, Potteaux S, Joffre J, et al. Natural Regulatory T Cells Limit Angiotensin II-Induced Aneurysm Formation and Rupture in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2374–2379.
117. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhalawon B, Taleb S, et al. TGF- β activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422–32.

118. Allali D, Chizzolini C. [Systemic vasculitides: novel nomenclature and novel therapeutic approaches]. *Rev Med Suisse*. 2014;10:854–8.
119. Lee JL, Naguwa SM, Cheema GS, Gershwin ME. The geo-epidemiology of temporal (giant cell) arteritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35:88–95.
120. Rahman W, Rahman FZ. Giant cell (temporal) arteritis: an overview and update. *Surv Ophthalmol*. 2005;50:415–28.
121. Hill CL, Black RJ, Nossent JC, Ruediger C, Nguyen L, Ninan JV, et al. Risk of mortality in patients with giant cell arteritis: A systematic review and meta-analysis. In: *Seminars in arthritis and rheumatism* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2017 Jul 25]. p. 513–519. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017216301433>
122. Hayreh SS, Podhajsky PA, Zimmerman B. Ocular manifestations of giant cell arteritis. *Am J Ophthalmol*. 1998;125:509–20.
123. Robson JC, Kiran A, Maskell J, Hutchings A, Arden N, Dasgupta B, et al. The relative risk of aortic aneurysm in patients with giant cell arteritis compared with the general population of the UK. *Ann Rheum Dis*. 2015;74:129–35.
124. Evans JM, O’Fallon WM, Hunder GG. Increased incidence of aortic aneurysm and dissection in giant cell (temporal) arteritis. A population-based study. *Ann Intern Med*. 1995;122:502–7.
125. Onen F, Akkoc N. Epidemiology of Takayasu arteritis. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. 2017;
126. Ishikawa K. Diagnostic approach and proposed criteria for the clinical diagnosis of Takayasu’s arteriopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:964–72.
127. Park M-C, Lee S-W, Park Y-B, Chung NS, Lee S-K. Clinical characteristics and outcomes of Takayasu’s arteritis: analysis of 108 patients using standardized criteria for diagnosis, activity assessment, and angiographic classification. *Scand J Rheumatol*. 2005;34:284–92.
128. Sharma S, Rajani M, Talwar KK. Angiographic morphology in nonspecific aortoarteritis (Takayasu’s arteritis): a study of 126 patients from north India. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1992;15:160–5.
129. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med*. 1994;120:919–29.
130. Seko Y, Minota S, Kawasaki A, Shinkai Y, Maeda K, Yagita H, et al. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu’s arteritis. *J Clin Invest*. 1994;93:750.
131. Saadoun D, Garrido M, Comarmond C, Desbois AC, Domont F, Savey L, et al. Th1 and Th17 cytokines drive inflammation in Takayasu arteritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015;67:1353–60.
132. Arnaud L, Haroche J, Mathian A, Gorochov G, Amoura Z. Pathogenesis of Takayasu’s arteritis: a 2011 update. *Autoimmun Rev*. 2011;11:61–7.
133. Aggarwal A, Chag M, Sinha N, Naik S. Takayasu’s arteritis: role of *Mycobacterium tuberculosis* and its 65 kDa heat shock protein. *Int J Cardiol*. 1996;55:49–55.

134. Carvalho ES, de Souza AW, Leão SC, Levy-Neto M, de Oliveira RS, Drake W, et al. Absence of mycobacterial DNA in peripheral blood and artery specimens in patients with Takayasu arteritis. *Clin Rheumatol*. 2017;36:205–208.
135. Brack A, Geisler A, Martinez-Taboada VM, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med*. 1997;3:530.
136. Weyand CM, Goronzy JJ. Giant-Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica. Solomon CG, editor. *N Engl J Med*. 2014;371:50–7.
137. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM. Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis. *Circulation*. 2010;121:906–15.
138. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, et al. Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:3788–98.
139. Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, et al. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 2012;64:2001–11.
140. Espígol-Frigolé G, Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Segarra M, García-Martínez A, et al. Increased IL-17A expression in temporal artery lesions is a predictor of sustained response to glucocorticoid treatment in patients with giant-cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:1481–7.
141. Piggott K, Deng J, Warrington K, Younge B, Kubo JT, Desai M, et al. Blocking the NOTCH pathway inhibits vascular inflammation in large-vessel vasculitis. *Circulation*. 2011;123:309–18.
142. Ciccía F, Alessandro R, Rizzo A, Principe S, Raiata F, Cavazza A, et al. Expression of interleukin-32 in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63:2097–104.
143. Ciccía F, Rizzo A, Guggino G, Cavazza A, Alessandro R, Maugeri R, et al. Difference in the expression of IL-9 and IL-17 correlates with different histological pattern of vascular wall injury in giant cell arteritis. *Rheumatology*. 2015;54:1596–604.
144. Samson M, Ly KH, Tournier B, Janikashvili N, Trad M, Ciudad M, et al. Involvement and prognosis value of CD8(+) T cells in giant cell arteritis. *J Autoimmun*. 2016;72:73–83.
145. van der Geest KSM, Abdulahad WH, Chalan P, Rutgers A, Horst G, Huitema MG, et al. Disturbed B Cell Homeostasis in Newly Diagnosed Giant Cell Arteritis and Polymyalgia Rheumatica: B Cells in GCA and PMR. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66:1927–38.
146. Nagel MA, White T, Khmeleva N, Rempel A, Boyer PJ, Bennett JL, et al. Analysis of Varicella-Zoster Virus in Temporal Arteries Biopsy Positive and Negative for Giant Cell Arteritis. *JAMA Neurol*. 2015;72:1281.
147. Gilden D, White TM, Nagae L, Gurdin WH, Boyer PJ, Nagel MA. Successful Antiviral Treatment of Giant Cell Arteritis and Takayasu Arteritis. *JAMA Neurol*. 2015;72:943–6.
148. Muratore F, Croci S, Tamagnini I, Zerbini A, Bellafiore S, Belloni L, et al. No detection of varicella-zoster virus in temporal arteries of patients with giant cell arteritis. *Semin Arthritis*

- Rheum [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 2]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0049017216304322>
149. Watanabe R, Zhang H, Berry G, Goronzy JJ, Weyand CM. Immune checkpoint dysfunction in large and medium vessel vasculitis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312:H1052–9.
 150. Deng J, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circ Res*. 2009;104:488–495.
 151. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-Specific Toll-Like Receptor Profiles in Human Medium and Large Arteries. *Circulation*. 2008;118:1276–84.
 152. Soussan M, Nicolas P, Schramm C, Katsahian S, Pop G, Fain O, et al. Management of large-vessel vasculitis with FDG-PET: a systematic literature review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:e622.
 153. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Raimondo S, Giardina A, Raiata F, et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72:258–264.
 154. Numano F, Okawara M, Inomata H, Kobayashi Y. Takayasu's arteritis. *Lancet Lond Engl*. 2000;356:1023–5.
 155. Saadoun D, Garrido M, Comarmond C, Desbois AC, Domont F, Savey L, et al. Th1 and Th17 cytokines drive Takayasu Arteritis inflammation. *Arthritis Rheumatol Hoboken NJ*. 2015;
 156. Márquez A, Solans R, Hernández-Rodríguez J, Cid MC, Castañeda S, Ramentol M, et al. A candidate gene approach identifies an IL33 genetic variant as a novel genetic risk factor for GCA. *PloS One*. 2014;9:e113476.
 157. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1122–8.
 158. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Takayasu arteritis. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 Jul 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/1975175>
 159. Kerr GS, Hallahan CW, Giordano J, Leavitt RY, Fauci AS, Rottem M, et al. Takayasu arteritis. *Ann Intern Med*. 1994;120:919–29.
 160. Saleh R, Wedeh G, Herrmann H, Bibi S, Cerny-Reiterer S, Sadovnik I, et al. A new human mast cell line expressing a functional IgE receptor converts to tumorigenic growth by KIT D816V transfection. *Blood*. 2014;124:111–20.
 161. Maneglier B, Rogez-Kreuz C, Cordonnier P, Therond P, Advenier C, Dormont D, et al. Simultaneous measurement of kynurenine and tryptophan in human plasma and supernatants of cultured human cells by HPLC with coulometric detection. *Clin Chem*. 2004;50:2166–8.
 162. Baekkevold ES, Roussigné M, Yamanaka T, Johansen F-E, Jahnsen FL, Amalric F, et al. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol*. 2003;163:69–79.

163. Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, K  chler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* 2009;30:227–33.
164. Miller AM. Role of IL-33 in inflammation and disease. *J Inflamm Lond.* 2011;8:22.
165. Bartunek J, Delrue L, Van Durme F, Muller O, Casselman F, De Wiest B, et al. Nonmyocardial production of ST2 protein in human hypertrophy and failure is related to diastolic load. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:2166–74.
166. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:103–10.
167. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fr  hlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature.* 2014;513:564–8.
168. Orabona C, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase and regulatory function: tryptophan starvation and beyond. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;677:269–80.
169. Lu L-F, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, et al. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 2006;442:997–1002.
170. Rodrigues CP, Ferreira ACF, Pinho MP, de Moraes CJ, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Tolerogenic IDO+ dendritic cells are induced by PD-1-expressing mast cells. *Front Immunol* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 25];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4724729/>
171. Leveson-Gower DB, Sega EI, Kalesnikoff J, Florek M, Pan Y, Pierini A, et al. Mast cells suppress murine GVHD in a mechanism independent of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood.* 2013;122:3659–65.
172. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, et al. An interleukin-33-mast cell-interleukin-2 axis suppresses papain-induced allergic inflammation by promoting regulatory T cell numbers. *Immunity.* 2015;43:175–186.
173. Weyand CM, Goronzy JJ. Medium-and large-vessel vasculitis. *N Engl J Med.* 2003;349:160–169.
174. Seko Y, Minota S, Kawasaki A, Shinkai Y, Maeda K, Yagita H, et al. Perforin-secreting killer cell infiltration and expression of a 65-kD heat-shock protein in aortic tissue of patients with Takayasu’s arteritis. *J Clin Invest.* 1994;93:750.
175. Seko Y, Sato O, Takagi A, Tada Y, Matsuo H, Yagita H, et al. Restricted usage of T-cell receptor Valpha-Vbeta genes in infiltrating cells in aortic tissue of patients with Takayasu’s arteritis. *Circulation.* 1996;93:1788–90.
176. Kaiser M, Younge B, Bj  rnsson J, Goronzy JJ, Weyand CM. Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells. *Am J Pathol.* 1999;155:765–74.
177. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008;205:339–46.

178. Ligi I, Simoncini S, Tellier E, Vassallo PF, Sabatier F, Guillet B, et al. A switch toward angiostatic gene expression impairs the angiogenic properties of endothelial progenitor cells in low birth weight preterm infants. *Blood*. 2011;118:1699–709.
179. Cid MC, Cebrián M, Font C, Coll-Vinent B, Hernández-Rodríguez J, Esparza J, et al. Cell adhesion molecules in the development of inflammatory infiltrates in giant cell arteritis: inflammation-induced angiogenesis as the preferential site of leukocyte-endothelial cell interactions. *Arthritis Rheum*. 2000;43:184–94.
180. Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S, Sallenave J-M, et al. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009;183:1446–55.
181. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 1998;101:731–6.
182. Seki K, Sanada S, Kudinova AY, Steinhäuser ML, Handa V, Gannon J, et al. Interleukin-33 prevents apoptosis and improves survival after experimental myocardial infarction through ST2 signaling. *Circ Heart Fail*. 2009;CIRCHEARTFAILURE–109.
183. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, Kimura H, Kamata Y, Nagatani K, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2010;37:18–25.
184. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clin Rheumatol*. 2011;30:825–30.
185. Mchedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. 2013;39:357–371.
186. Zhang H, Watanabe R, Berry GJ, Vaglio A, Liao YJ, Warrington KJ, et al. Immunoinhibitory checkpoint deficiency in medium and large vessel vasculitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E970–9.
187. Deng J, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Toll-Like Receptors 4 and 5 Induce Distinct Types of Vasculitis. *Circ Res*. 2009;104:488–95.
188. Ciccía F, Rizzo A, Ferrante A, Guggino G, Croci S, Cavazza A, et al. New insights into the pathogenesis of giant cell arteritis. *Autoimmun Rev*. 2017;16:675–83.
189. Clement M, Galy A, Bruneval P, Morvan M, Hyafil F, Benali K, et al. Tertiary lymphoid Organs in Takayasu arteritis. *Front Immunol [Internet]*. 2016 [cited 2017 Jul 25];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840206/>
190. Ciccía F, Rizzo A, Maugeri R, Alessandro R, Croci S, Guggino G, et al. Ectopic expression of CXCL13, BAFF, APRIL and LT- β is associated with artery tertiary lymphoid organs in giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;76:235–43.
191. Kumar Chauhan S, Kumar Tripathy N, Sinha N, Singh M, Nityanand S. Cellular and humoral immune responses to mycobacterial heat shock protein-65 and its human homologue in Takayasu's arteritis. *Clin Exp Immunol*. 2004;138:547–553.

192. Schultz DR, Arnold PI. Heat shock (stress) proteins and autoimmunity in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum.* 1993;22:357–74.
193. Arnaud L, Cambau E, Brocheriou I, Koskas F, Kieffer E, Piette J-C, et al. Absence of *Mycobacterium tuberculosis* in arterial lesions from patients with Takayasu's arteritis. *J Rheumatol.* 2009;36:1682–5.
194. Rawlings DJ, Metzler G, Wray-Dutra M, Jackson SW. Altered B cell signalling in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2017;17:421–36.
195. Noris M, Daina E, Gamba S, Bonazzola S, Remuzzi G. Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions? *Circulation.* 1999;100:55–60.
196. Terrier B, Geri G, Chaara W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, et al. Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* 2012;64:2001–11.
197. Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, et al. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity.* 2011;35:986–96.
198. Hoyer BF, Mumtaz IM, Loddenkemper K, Bruns A, Sengler C, Hermann K-G, et al. Takayasu arteritis is characterised by disturbances of B cell homeostasis and responds to B cell depletion therapy with rituximab. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:75–9.
199. Odegard JM, Marks BR, DiPlacido LD, Poholek AC, Kono DH, Dong C, et al. ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2008;205:2873–86.
200. Guilpain P, Mouthon L. Antiendothelial cells autoantibodies in vasculitis-associated systemic diseases. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2008;35:59–65.
201. Chauhan SK, Tripathy NK, Nityanand S. Antigenic targets and pathogenicity of anti-aortic endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2326–33.
202. Park M, Park Y, Jung SY, Lee KH, Lee S. Anti-endothelial cell antibodies and antiphospholipid antibodies in Takayasu's arteritis: correlations of their titers and isotype distributions with disease activity. *Clin Exp Rheumatol.* 2006;24:S10.
203. Kang S, Fedoriw Y, Brenneman EK, Truong YK, Kikly K, Vilen BJ. BAFF Induces Tertiary Lymphoid Structures and Positions T Cells within the Glomeruli during Lupus Nephritis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2017;198:2602–11.
204. Pitzalis C, Jones GW, Bombardieri M, Jones SA. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:447–62.
205. Pattarini L, Trichot C, Bogiatzi S, Grandclaude M, Meller S, Keuylian Z, et al. TSLP-activated dendritic cells induce human T follicular helper cell differentiation through OX40-ligand. *J Exp Med.* 2017;214:1529–46.
206. Karadag O, Aksu K, Sahin A, Zihni FY, Sener B, Inanc N, et al. Assessment of latent tuberculosis infection in Takayasu arteritis with tuberculin skin test and Quantiferon-TB Gold test. *Rheumatol Int.* 2010;30:1483–7.

207. Seko Y, Takahashi N, Tada Y, Yagita H, Okumura K, Nagai R. Restricted usage of T-cell receptor Vgamma-Vdelta genes and expression of costimulatory molecules in Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol.* 2000;75 Suppl 1:S77-83; discussion S85-87.
208. Chauhan SK, Tripathy NK, Nityanand S. Antigenic targets and pathogenicity of anti-aortic endothelial cell antibodies in Takayasu arteritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:2326–33.
209. Li M, Li Y, Liu X, Gao X, Wang Y. IL-33 blockade suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 2012;247:25–31.
210. Jiang H-R, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard A-G, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 2012;42:1804–14.
211. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 2003;24:242–8.
212. Matta BM, Lott JM, Mathews LR, Liu Q, Rosborough BR, Blazar BR, et al. IL-33 is an unconventional Alarmin that stimulates IL-2 secretion by dendritic cells to selectively expand IL-33R/ST2+ regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014;193:4010–20.
213. Baumann C, Bonilla WV, Fröhlich A, Helmstetter C, Peine M, Hegazy AN, et al. T-bet–and STAT4–dependent IL-33 receptor expression directly promotes antiviral Th1 cell responses. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112:4056–4061.
214. Rood JE, Rao S, Paessler M, Kreiger PA, Chu N, Stelekati E, et al. ST2 contributes to T-cell hyperactivation and fatal hemophagocytic lymphohistiocytosis in mice. *Blood.* 2016;127:426–435.
215. Reichenbach DK, Schwarze V, Matta BM, Tkachev V, Lieberknecht E, Liu Q, et al. The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood.* 2015;125:3183–92.
216. Matta BM, Reichenbach DK, Zhang X, Mathews L, Koehn BH, Dwyer GK, et al. Peri-alloHCT IL-33 administration expands recipient T-regulatory cells that protect mice against acute GVHD. *Blood.* 2016;128:427–39.
217. Groß P, Doser K, Falk W, Obermeier F, Hofmann C. IL-33 attenuates development and perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18:1900–9.
218. Grimaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell–derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol.* 2007;8:1095–104.
219. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6:135–42.
220. Wen Z, Shen Y, Berry G, Shahram F, Li Y, Watanabe R, et al. The microvascular niche instructs T cells in large vessel vasculitis via the VEGF-Jagged1-Notch pathway. *Sci Transl Med.* 2017;9.
221. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CGK, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol.* 2011;12:1045–54.

222. Samson M, Bonnotte B. Pathogénie de l'artérite à cellules géantes. *Presse Médicale*. 2012;41:937–47.
223. Maleszewski JJ, Younge BR, Fritzlen JT, Hunder GG, Goronzy JJ, Warrington KJ, et al. Clinical and pathological evolution of giant cell arteritis: a prospective study of follow-up temporal artery biopsies in 40 treated patients. *Mod Pathol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Aug 2]; Available from: <https://www.nature.com/articles/modpathol201710>
224. Samson M, Ghesquière T, Berthier S, Bonnotte B. Ustekinumab inhibits Th1 and Th17 polarisation in a patient with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis*. 2017;