

L'autophagie dans les cellules dendritiques promeut des lymphocytes CD4⁺ protecteurs contre l'athérosclérose

Marc Clément¹, Juliette Raffort^{1,2}, Fabien Lareyre^{1,2}, Ziad Mallat^{1,3}

¹Division of cardiovascular medicine, Université de Cambridge, Addenbrooke's Hospital, CB20QQ Cambridge, Royaume Uni.

²Université Côte d'Azur, Inserm, Centre méditerranéen de recherche moléculaire, Hôpital universitaire de Nice, 06003 Nice, France.

³Inserm, Centre de recherche cardiovasculaire (PARCC) HEGP, 75015 Paris, France. ziad.mallat@inserm.fr

► L'athérosclérose est une lésion des artères de gros et moyen calibres. Elle est responsable de la survenue d'événements cardiovasculaires indésirables, tels que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité, et une meilleure compréhension des mécanismes contribuant au développement de l'athérosclérose permettra de développer de nouveaux moyens thérapeutiques [1]. L'implication d'une réponse inflammatoire en réponse à l'agression chronique des vaisseaux avait été suggérée et étudiée depuis plus de 30 ans, mais ce n'est que très récemment que les premiers résultats d'essais thérapeutiques impliquant directement l'inflammation dans la survenue d'événements cardiovasculaires indésirables chez l'homme ont été obtenus [2]. En effet, les lipoprotéines oxydées qui s'accumulent dans la paroi artérielle sont reconnues comme un signal de « danger » par les récepteurs du système immunitaire inné, qui sont exprimés aussi bien sur les cellules vasculaires que sur les cellules immunitaires innées attirées dans la paroi vasculaire par activation de ce système [3]. Ces cellules inflammatoires, particulièrement les macrophages, sont importantes pour « nettoyer » les produits toxiques accumulés, mais une fois engorgées, elles finissent par mourir dans la lésion vasculaire naissante. L'altération des capacités de nettoyage de ces cellules entraîne l'accumulation de débris cellulaires, contribuant ainsi à la formation du noyau nécrotique de la plaque d'athérome. Nous avons récem-

ment montré que la reconnaissance de ces débris nécrotiques par le système immunitaire inné perpétue l'inflammation chronique au sein de la plaque d'athérome via la stimulation de récepteurs comme CLEC4E ou CLEC9A (*C-type lectin-like receptors*, CTLR), exprimés par les cellules myéloïdes et capables de reconnaître des motifs moléculaires exposés lors de la nécrose cellulaire [4,5]. Empêcher la formation du noyau nécrotique et la réponse inflammatoire associée constitue donc un enjeu primordial dans la prévention des événements cardiovasculaires indésirables.

La présence de cellules présentatrices d'antigènes, comme les cellules dendritiques (DC, *dendritic cells*), dans la paroi artérielle contribue à l'activation de cellules de l'immunité adaptative, dont font partie les lymphocytes T CD4⁺, via la présentation d'antigènes dérivés des lipoprotéines oxydées et reconnus comme du « non-soi » [6]. La différenciation de ces lymphocytes en lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1), produisant l'interféron gamma (IFN- γ) et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), ou en lymphocytes T régulateurs (Treg), exprimant le facteur de transcription Foxp3, dépend de l'état d'activation de la cellule dendritique (qui exprime alors des molécules de co-stimulation) et de l'environnement cytokinique lors de la présentation d'antigène au lymphocyte T naïf. Dans le contexte de l'athérosclérose, les lymphocytes Th1 sont principalement considérés comme pro-athérogènes, alors que les lymphocytes Treg ont des propriétés athéro-protectrices, principalement en favorisant la

résolution de l'inflammation et la réparation de la paroi vasculaire [6].

Il existe quatre types principaux de DC chez la souris : dans les organes lymphoïdes, il s'agit de DC résidentes CD8 α ⁺CD11b⁻ et CD8 α ⁻CD11b⁺, alors que dans les autres tissus, ce sont des DC CD103⁺CD11b⁻ et CD103⁻CD11b⁺. Le développement de ces sous-types de DC est dépendant de facteurs de transcription, IRF8/BATF3 pour les cellules CD8 α ⁺CD11b⁻ et CD103⁺CD11b⁻, et RBPJ/IRF4 pour les cellules CD11b⁺. Nous avons récemment montré que l'activation pro-athérogène des lymphocytes Th1 était dépendante de l'expression d'IRF8 par les DC [7].

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés au rôle de l'autophagie dans les DC. Au cours de l'autophagie, des vésicules intracellulaires se spécialisent dans la dégradation de divers organelles et protéines afin de les recycler. La formation des vésicules d'autophagie dépend d'un complexe protéique formé par ATG5, ATG12 et ATG16L1. Ces protéines permettent la lipidation de la protéine LC3, qui sera enchâssée dans la membrane de l'autophagosome pour contribuer à son élongation et à sa fermeture. Une fois scellé, l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour former un autophagolysosome, qui dégrade le matériel séquestré (cargo autophagique). Les DC possèdent des lysosomes particuliers qui leur permettent d'apprêter au mieux les peptides antigéniques (pH faiblement acide). La fusion des vésicules d'autophagie avec les lysosomes contribue à

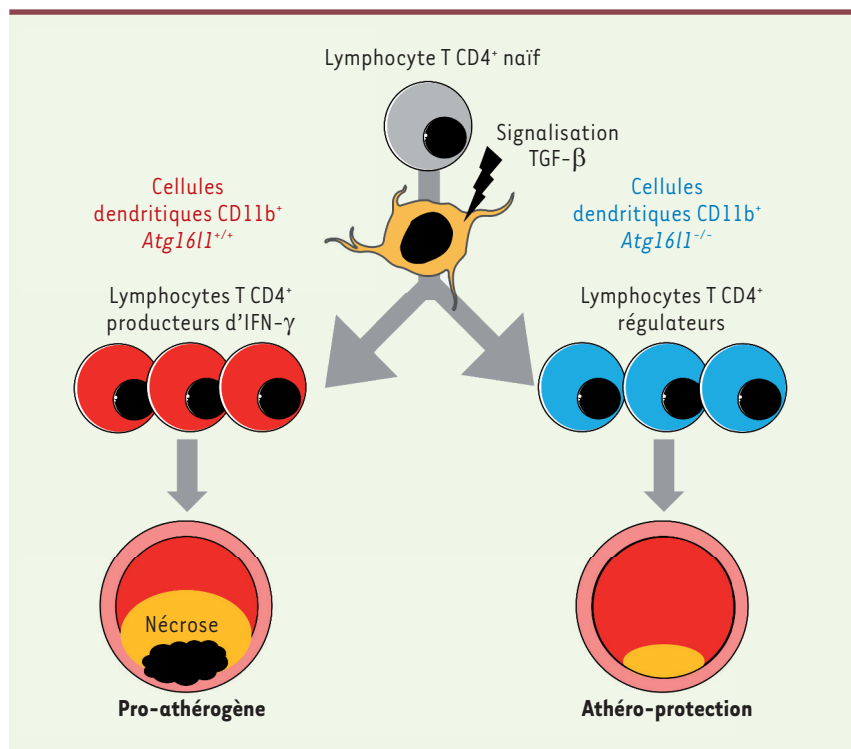


Figure 1. Représentation schématique du rôle de l'autophagie des cellules dendritiques dans la modulation de la réponse immunitaire et le développement de l'athérosclérose. La suppression de la protéine ATG16L1, donc de l'autophagie, dans les cellules dendritiques CD11b⁺ (*Atg16l1*^{-/-}, à droite) modifie profondément leur réponse au TGF-β, et favorise ainsi la production de lymphocytes T CD4⁺ régulateurs (Treg) aux dépens des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IFN-γ (Th1), ce qui réduit le développement des plaques d'athérome.

la production des banques d'antigènes présentés par les DC. Celles-ci étant présentes à la fois dans les organes lymphoïdes secondaires, comme la rate, et les artères athéromateuses, nous nous sommes demandés si l'autophagie dans les DC pouvait contribuer à l'activation et à la polarisation des lymphocytes CD4⁺ naïfs au cours de l'athérosclérose et modifier son évolution.

Afin d'étudier le flux autophagique dans les DC au cours de l'athérogenèse, nous avons utilisé un modèle de souris mutantes dépourvues du récepteur des lipoprotéines de faible densité (souris *Ldlr*^{-/-}), transplantées avec une moelle osseuse provenant de souris transgéniques exprimant la protéine LC3 étiquetée avec la *green fluorescent protein* (LC3-GFP). L'analyse des DC de la rate et des artères de ces souris par cytométrie en flux a montré que ces cellules expri-

maient plus fortement la GFP que les autres cellules immunitaires. Un régime alimentaire athérogène et l'administration à ces souris de chloroquine, un inhibiteur de la fusion des lysosomes avec les autophagosomes, ont augmenté l'expression de la LC3-GFP dans les DC CD11b⁺ de la rate et les DC CD103⁺CD11b⁻ des artères, montrant que le flux autophagique de ces DC était actif dans ces conditions expérimentales [8].

Pour savoir si l'activation de l'autophagie dans les DC jouait un rôle sur l'activation de la réponse immunitaire associée à l'athérosclérose, nous avons transplanté les souris *Ldlr*^{-/-} avec une moelle osseuse issue de souris *Atg16l1*^{flox/flox} exprimant ou non la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Itgax* (exprimé spécifiquement dans les DC et une sous-population de macrophages). Après 8 semaines de régime athérogène,

les souris *Ldlr*^{-/-} transplantées dont les DC étaient dépourvues de la protéine ATG16L1 (souris *Itgax*^{cre+}, *Atg16l1*^{flox/flox}), donc déficientes pour l'autophagie, avaient un nombre de DC dans la rate équivalent à celui des souris transplantées témoins. En revanche, l'expression des protéines de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) par ces cellules était significativement diminuée. Cette diminution était associée à une réduction significative du nombre de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la rate par rapport aux souris témoins, et à un changement qualitatif important : la proportion des lymphocytes Treg était augmentée. Dans la paroi des artères athéromateuses, l'accumulation des DC était équivalente dans les deux groupes de souris, mais la proportion de lymphocytes Treg était supérieure chez les souris dont les DC étaient déficientes pour l'autophagie, et cette augmentation s'accompagnait d'une réduction de la proportion de lymphocytes Th1, du développement de l'athérosclérose, et du noyau nécrotique de la plaque athéromateuse [8]. De plus, une déplétion en lymphocytes T a empêché la réduction de l'athérosclérose que nous avons observée chez ces souris, ce qui indiquait que la présence de lymphocytes T était nécessaire pour que l'absence d'autophagie dans les DC protège contre l'athérosclérose [8].

Afin d'affiner notre analyse, des souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur du gène *Clec9a* (dont l'expression est plus spécifique des DC CD8α⁺ et CD103⁺) ont été croisées avec les souris *Atg16l1*^{flox/flox}. Après la transplantation de moelle et 8 semaines de régime athérogène, aucune différence en ce qui concerne l'athérosclérose ou les lymphocytes T n'a été observée entre les souris *Clec9a*^{cre+} *Atg16l1*^{flox/flox}, déficientes pour l'autophagie dans les DC CD8α⁺ et CD103⁺, et les souris témoins, suggérant que la protection contre l'athérosclérose implique l'absence d'autophagie dans les DC CD11b⁺. L'analyse par ARN-seq de DC triées par FACS (*fluores-*

cence-activated cell sorting) et provenant de souris *Ldlr^{-/-}* soumises à un régime alimentaire athérogène a permis de découvrir que l'absence de la protéine ATG16L1 dans les DC CD11b⁺ modifiait leur transcriptome, et suggérait la possibilité qu'une exposition au TGF-β associée au régime athérogène les rende capables d'induire des lymphocytes Treg [8].

Nous avons alors testé la capacité de DC CD11b⁺ déficientes pour l'autophagie à induire des lymphocytes Treg en utilisant plusieurs systèmes *in vitro*. L'utilisation de DC CD11b⁺ comme cellules co-stimulatrices, en présence d'un anticorps anti-CD3 soluble pour stimuler les lymphocytes T CD4⁺ naïfs de façon polyclonale, n'a pas permis d'induire plus de lymphocytes Treg en réponse au TGF-β quand l'autophagie était déficiente dans les DC. En revanche, l'utilisation de lymphocytes CD4⁺ naïfs provenant des souris transgéniques OTII (possédant un récepteur des lymphocytes T spécifique de peptides dérivés de l'ovalbumine de poulet, présentés par des molécules de classe II du CMH), et de l'ovalbumine, qui doit être apprêtée par les DC pour pouvoir présenter un peptide antigénique en association avec des molécules de classe II du CMH, a permis de découvrir que les DC CD11b⁺ déficientes pour l'autophagie, mais pas les DC CD8α⁺,

induisaient une forte prolifération et une différenciation des lymphocytes CD4⁺ naïfs en lymphocytes Treg en présence de TGF-β [8] (Figure 1).

Afin de montrer que les lymphocytes Treg étaient bien la sous-population des lymphocytes T qui permettait aux DC CD11b⁺ déficientes pour l'autophagie de prévenir le développement de l'athérosclérose, les souris *Ldlr^{-/-}* transplantées avec une moelle osseuse *Itgax^{cre+} Atg-16^{flox/flox}* ont été immuno-déplétées en lymphocytes Treg (en utilisant un anticorps anti-CD25, PC61), et nous avons alors observé une normalisation de la taille des plaques d'athérome et une augmentation de leur noyau nécrotique, confirmant ainsi l'hypothèse [8].

Nous avons donc montré qu'inhiber l'autophagie des DC CD11b⁺ favorise l'induction de lymphocytes Treg et prévient le développement de l'athérosclérose dans un modèle expérimental murin (Figure 1). Ces résultats suggèrent aussi des possibilités d'amélioration des stratégies vaccinales visant à induire des lymphocytes Treg afin de prévenir ou retarder le développement de l'athérosclérose, en dirigeant les antigènes désirés (peptides dérivés des apolipoprotéines) vers les DC CD11b⁺ (avec des anticorps spécifiques par exemple) et en y associant des inhibiteurs de l'auto-

phagie afin de promouvoir le développement de lymphocytes Treg spécifiques et athéro-protecteurs. ♦

Autophagy in dendritic cells promotes atheroprotective regulatory T cells

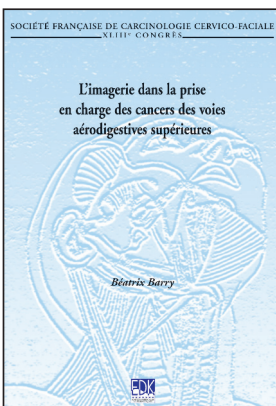
LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Zhao TX, Mallat Z. Targeting the immune system in atherosclerosis: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2019 ; 73 : 1691-706.
2. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med* 2017 ; 377 : 1119-31.
3. Libby P, Tabas I, Fredman G, Fisher EA. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circ Res* 2014 ; 114 : 1867-79.
4. Clement M, Basatemur G, Masters L, et al. Necrotic cell sensor Clec4e promotes a proatherogenic macrophage phenotype through activation of the unfolded protein response. *Circulation* 2016 ; 134 : 1039-51.
5. Haddad Y, Lahoute C, Clement M, et al. The dendritic cell receptor DNGR-1 promotes the development of atherosclerosis in mice. *Circ Res* 2017 ; 121 : 234-43.
6. Ait-Oufella H, Sage AP, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive (T and B cells) immunity and control by dendritic cells in atherosclerosis. *Circ Res* 2014 ; 114 : 1640-60.
7. Clement M, Haddad Y, Raffort J, et al. Deletion of IRF8 (interferon regulatory factor 8)-dependent dendritic cells abrogates proatherogenic adaptive immunity. *Circ Res* 2018 ; 122 : 813-20.
8. Clement M, Raffort J, Lareyre F, et al. Impaired autophagy in CD11b⁺ dendritic cells expands CD4⁺ regulatory T cells and limits atherosclerosis in mice. *Circ Res* 2019 ; 125 : 1019-34.

Bon de commande



À retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis Cedex

Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **L'imagerie dans la prise en charge des cancers des voies aérodigestives supérieures** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |