



## L'inhibition du récepteur de l'EGF sur les cellules immunitaires réduit l'athérosclérose expérimentale

Lynda Zeboudj<sup>1</sup>, Pierre-Louis Tharoux<sup>1</sup>, Hafid Ait-Oufella<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm U970, centre de recherches cardiovasculaires de Paris, université René Descartes, Paris 5, 75005 Paris, France.

<sup>2</sup>Service de réanimation médicale, hôpital Saint-Antoine, AP-HP, université Pierre-et-Marie Curie, Paris 6, 56, rue Leblanc, 75015 Paris, France.

[hafid.aitoufella@inserm.fr](mailto:hafid.aitoufella@inserm.fr)

### Les maladies cardiovasculaires

#### Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires, incluant l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux, représentent un problème de santé publique majeur avec plus de 17 millions de décès en 2015, soit un tiers de la mortalité mondiale totale. Les projections épidémiologiques à l'horizon 2030 sont encore plus alarmantes avec 23 millions de décès estimés [1], et ce malgré l'amélioration des stratégies de prévention et de traitement.

#### Physiopathologie

Les travaux réalisés chez l'animal et chez l'homme ont clairement montré que l'athérosclérose, la principale étiologie des maladies cardiovasculaires, est une maladie inflammatoire chronique des artères de gros et moyen calibres [2] (→).

(→) Voir la Synthèse de M. Hamze et al., m/s n° 10, octobre 2014, page 874

Les différentes étapes de l'athérogenèse comprennent la rétention et l'oxydation des lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial, l'activation des cellules endothéliales et le recrutement des monocytes circulants dans la paroi vasculaire. Au niveau de l'intima, la tunique interne du vaisseau sanguin, les monocytes se différencient en macrophages tissulaires sous l'effet du facteur de croissance M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Les macrophages jouent un rôle clé dans le déve-

loppement de l'athérosclérose, du fait de leur accumulation locale, de leur transformation en cellules spumeuses, de leur capacité à amplifier la réponse immuno-inflammatoire en produisant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL(interleukine)-12 p70 et le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-alpha*), ou en activant localement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1 (*T helper type 1*) [3]. Les macrophages participent également à la rupture des lésions d'athérosclérose (et aux thromboses artérielles consécutives) par de nombreux mécanismes : production de métalloprotéases matricielles, apoptose et formation de noyaux nécrotiques. Bien que les cellules de l'immunité innée jouent un rôle central dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires athéro-thrombotiques, nous ne disposons pas actuellement de traitement permettant de limiter spécifiquement leur pathogénicité.

#### Le récepteur du facteur de croissance épidermique

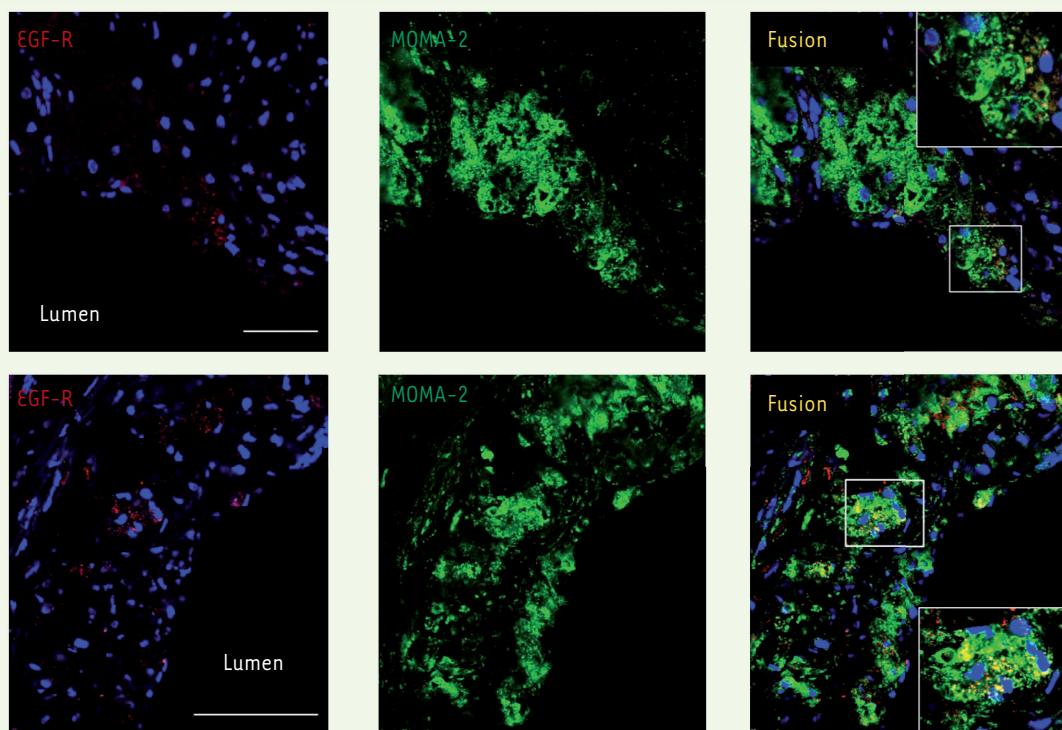
##### Généralités

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R, *epidermal growth factor-receptor*) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, appartenant à la famille Erb-B (*erythroblastic oncogene*), qui comporte 4 isoformes. L'activation de l'EGF-R, soit directement par ses ligands (comme l'HB-EGF [*heparin-binding EGF-like growth factor*], le TGF- $\alpha$  [*transforming*

*growth factor-alpha*], l'amphiréguline), soit par transactivation, induit une transition conformationnelle avec une homo- ou un hétéro-dimérisation [4]. L'EGF-R est exprimé par de nombreuses tumeurs, mais également par les cellules inflammatoires et vasculaires. Il est impliqué dans la survie cellulaire, la migration, l'adhérence et la prolifération cellulaire. C'est pourquoi, des thérapies ciblant l'EGF-R (les anticorps bloquant ou les inhibiteurs de tyrosine kinases) ont été développées avec succès pour le traitement des cancers bronchiques et pancréatiques [5].

#### EGF-R et athérosclérose - Données préliminaires

La stimulation de l'EGF-R participe au chimiotactisme des monocytes *in vitro* [6]. Lamb et ses collaborateurs ont détecté une expression d'EGF-R chez des lapins soumis à un régime gras à la fois sur les leucocytes circulants et sur les macrophages au sein des plaques d'athérosclérose [5]. Chez le primate, le régime riche en matières grasses induit une augmentation des taux plasmatiques d'HB-EGF, un des ligands de l'EGF-R, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de l'EGF-R dans la paroi artérielle. Ces anomalies disparaissent en quelques mois après retour à un régime normal [7]. L'EGF-R ainsi que ses ligands sont également présents en grande quantité dans les plaques d'athérosclérose chez l'homme [8]. Les concentrations plasmatiques d'HB-EGF



**Figure 1. L'EGF-R est exprimé dans les plaques d'athérosclérose.** Marquage par immunofluorescence révélant la présence du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*, EGF-R) (en rouge) dans les plaques d'athérosclérose de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> à un stade précoce (en haut) et un stade plus avancé (en bas) de l'athérosclérose. L'EGF-R est colocalisé (en jaune) avec les macrophages, repérés par un marqueur spécifique (MOMA+, en vert) (figure adaptée de [11]).

chez les patients coronariens sont plus élevées que celles de volontaires sains et elles sont corrélées à la cholestérolémie [9].

L'ensemble de ces données suggère que l'EGF-R est impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Cependant son rôle exact dans l'activité des cellules inflammatoires n'est pas connu tout comme les mécanismes physiopathologiques pro-athérogènes qu'il régule.

#### Modulation de l'EGF-R et athérosclérose

##### Expression de l'EGF-R

Nous avons confirmé que l'EGF-R est exprimé dans les plaques d'athérosclérose de souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> (déficientes en récepteur des lipoprotéines de basse densité) à un stade précoce de la maladie vasculaire (soit après 4 semaines de régime riche en matières grasses).

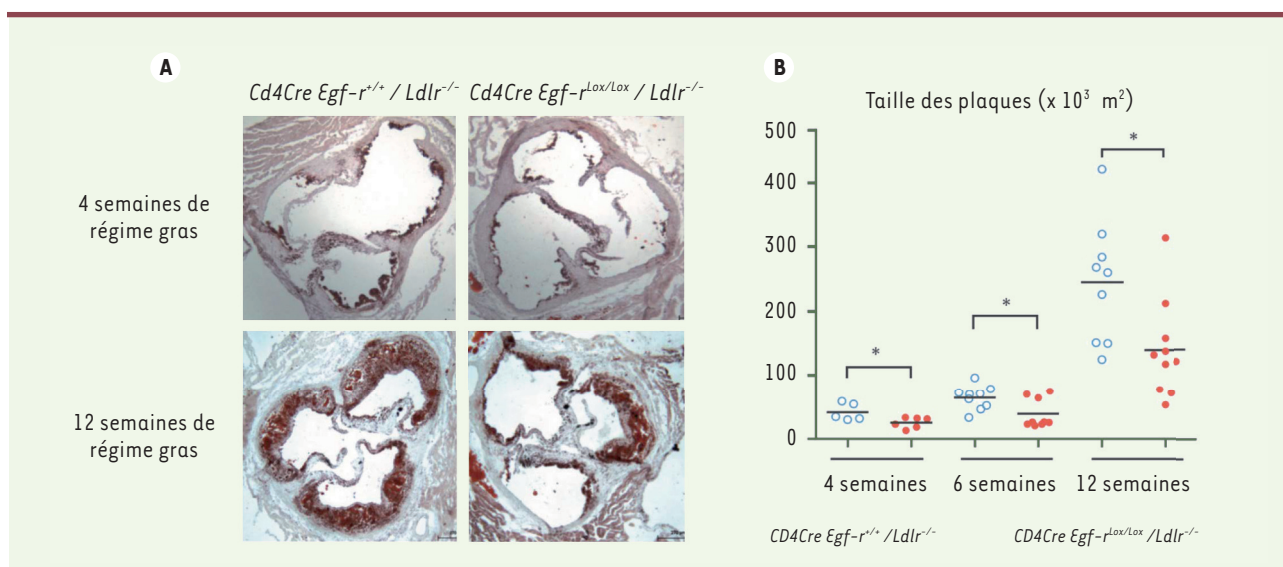
L'EGF-R, et un marqueur spécifique des monocytes/macrophages (MOMA-2) et des lymphocytes T sont co-localisés par immunofluorescence (Figure 1) [10]. À un stade plus avancé de la maladie, l'expression de l'EGF-R dans les plaques d'athérosclérose est plus importante, préférentiellement localisée autour du noyau nécrotique, riche en débris apoptotiques et en cristaux de cholestérol [11].

##### Inhibition pharmacologique de l'EGF-R

Afin d'évaluer le rôle de l'EGF-R dans l'athérogenèse, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité tyrosine kinase de l'EGF-R, l'Erlotinib. Nous avons montré que le traitement prolongé par voie orale par l'Erlotinib de souris déficientes en récepteur des lipoprotéines de basse densité (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) soumises à un régime riche en matières grasses réduit signifi-

cativement le développement et la progression de l'athérosclérose au niveau du sinus aortique et le long de l'aorte thoraco-abdominale, sans effet sur la cholestérolémie [10].

Le traitement affecte la réponse immunitaire systémique et plus spécifiquement la réponse adaptative, dans la mesure où les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spléniques des souris traitées par l'Erlotinib prolifèrent moins *ex vivo* et produisent moins de cytokines, comme l'IL-2 (interleukine-2), l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$  (interféron- $\gamma$ ). *In vitro*, l'incubation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de souris avec un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'activité tyrosine kinase de l'EGF-R réduit la prolifération cellulaire et la production de cytokines de façon dose-dépendante sans induire d'apoptose. Ces données ont été confirmées sur des lymphocytes T humains [10].



**Figure 2. La déficience en EGF-R spécifiquement sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réduit l'athérosclérose.** Des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> ont été irradiées et transplantées avec des cellules de moelle osseuse isolées de souris contrôles *Cd4Cre Egf-r<sup>+/+</sup>* ou de souris *Cd4Cre Egf-r<sup>lox/lox</sup>* déficientes en EGF-R (récepteur de l'EGF [epidermal growth factor]) spécifiquement sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. À différents temps d'un régime riche en matières grasses, les plaques d'athérosclérose ont été colorées à l'huile rouge (A) au niveau du sinus aortique et quantifiées (B). \*p < 0,05. Les souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> sont déficientes en récepteur des lipoprotéines de basse densité. Les souris (*Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>*) sont porteuses d'une délétion spécifique de l'EGF-R dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (figure adaptée de [11]).

#### Délétion spécifique de l'EGF-R dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

En utilisant un système Cre-Lox<sup>1</sup>, nous avons généré une lignée de souris ayant une délétion spécifique du gène codant l'EGF-R dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (*Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>*). Pour étudier les conséquences de cette déficience sur l'athérosclérose, nous avons utilisé un modèle chimère. Des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> ont été irradiées puis transplantées avec une moelle isolée de souris *Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>* <sup>2</sup> ou de souris contrôles *Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>+/+</sup>*. La déficience spécifique en EGF-R sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réduit leur activation (évaluée par l'expression de CD69 et de CD44<sup>high</sup>), leur prolifération *in vivo* et *ex vivo*, la production de cytokines pro-athérogènes comme l'IFN- $\gamma$  et leur capacité migratoire dans les lésions vasculaires. Finalement, nous avons montré que la déficience spécifique en EGF-R sur les

lymphocytes T CD4<sup>+</sup> réduit le développement de l'athérosclérose à différents temps (4, 6 et 12 semaines de régime riche en matières grasses) sans affecter la cholestérolémie (Figure 2) [10].

#### Délétion spécifique de l'EGF-R dans les cellules myéloïdes

Pour étudier spécifiquement le rôle de l'EGF-R exprimé par les monocytes/macrophages dans le contexte de l'athérosclérose, nous avons généré une lignée de souris *LysMCre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>*. La même approche expérimentale, que celle précédemment décrite, a été utilisée avec des souris *Ldlr*<sup>-/-</sup> chimères irradiées et transplantées avec la moelle de souris *LysMCre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>* ou de souris contrôle *LysMCre<sup>-</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>*. L'inactivation de l'EGF-R sur les cellules myéloïdes induit une réduction de la taille des lésions d'athérosclérose de l'ordre de 43 % après 4 semaines de régime riche en matière grasses, sans modifier la cholestérolémie. La réduction de la taille des plaques a également été observée à des stades plus avancés de la maladie vasculaire (après

7 et 12 semaines de régime riche en matières grasses) [11].

Les mécanismes athéro-protecteurs liés à l'inactivation de l'EGF-R sur les cellules myéloïdes sont probablement multiples : tout d'abord, en limitant le recrutement inflammatoire dans la paroi artérielle dans la mesure où dans les plaques des souris chimères *Ldlr*<sup>-/-</sup>/*LysMCre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>* une diminution significative de l'infiltration macrophagique est observée ; ensuite, par un effet sur la réponse cytokinique puisque la délétion en EGF-R s'accompagne d'une réduction significative de la production macrophagique *ex vivo* de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, deux médiateurs pro-athérogènes ; enfin, un autre mécanisme qui pourrait expliquer la réduction des plaques d'athérosclérose chez la souris chimère *Ldlr*<sup>-/-</sup>/*LysMCre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>* concerne le métabolisme des lipides. En effet, nous avons montré que les macrophages déficients en EGF-R (ou traités avec un inhibiteur spécifique de son activité tyrosine kinase) ont une capacité réduite d'endocytose des lipides oxydés. Parmi les récepteurs

<sup>1</sup> Cre-Lox : est un système de recombinaison qui permet de modifier l'expression d'un gène dans un tissu particulier.

<sup>2</sup> Chez les souris *Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>lox/lox</sup>*, les lymphocytes CD4 n'expriment pas l'EGF-R contrairement aux animaux contrôles : *Cd4Cre<sup>+</sup> Egf-r<sup>+/+</sup>*.

scavengers (éboueurs) impliqués dans ce processus, seul CD36<sup>3</sup> est diminué en l'absence d'EGF-R aux niveaux transcriptionnel et protéique (quantifiée par cytométrie en flux et *western-blot*). Dans les plaques d'athérosclérose des souris chimères l'expression du CD36 est également diminuée dans le groupe déficient en EGF-R sur les cellules myéloïdes, corroborant les résultats obtenus *in vitro* [11].

### Conclusion-Perspectives

L'EGF-R est exprimé par les cellules myéloïdes et les lymphocytes T. Son inhibition pharmacologique ou sa déficience génétique dans des modèles murins diminue l'activité pro-inflammatoire et pro-athérogène des macrophages, induit une anergie lymphocytaire T et *in fine* réduit

<sup>3</sup> CD36 est un récepteur éboueur connu sous le nom de glycoprotéine plaquettaire-4.

le développement et la progression de l'athérosclérose expérimentale.

Ces résultats sont rassurants sur le plan cardiovasculaire concernant l'utilisation des inhibiteurs de l'EGF-R chez les patients atteints de cancer et suggèrent même que ces molécules pourraient être utilisées comme traitement immunomodulateur des maladies cardiovasculaires. ♦

### EGF receptor blockade in immune cells reduces experimental atherosclerosis

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

#### RÉFÉRENCES

1. Beaglehole R, Bonita R. Global public health: a scorecard. *Lancet* 2008 ; 372 : 1988-96.
2. Hamze M, Desmetz C, Guglielmi P. Les lymphocytes B : une cible prometteuse pour traiter l'athérosclérose ? *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 874-81.
3. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 1685-95.
4. Avraham R, Yarden Y. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011 ; 12 : 104-17.
5. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004 ; 4 : 361-70.
6. Lamb DJ, Modjtahedi H, Plant NJ, Ferns GA. EGF mediates monocyte chemotaxis and macrophage proliferation and EGF receptor is expressed in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2004 ; 176 : 21-6.
7. Stanic B, Pandey D, Fulton DJ, Miller FJ Jr. Increased epidermal growth factor-like ligands are associated with elevated vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in a primate model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012 ; 32 : 2452-60.
8. Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, et al. Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996 ; 94 : 2778-86.
9. Matsumoto S, Kishida K, Shimomura I, et al. Increased plasma HB-EGF associated with obesity and coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 ; 292 : 781-6.
10. Zeboudj L, Maitre M, Guyonnet L, et al. Selective EGF-receptor inhibition in CD4<sup>+</sup> T cells induces anergy and limits atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2018 ; 71 : 160-72.
11. Zeboudj L, Giraud A, Guyonnet L, et al. Selective EGFR (epidermal growth factor receptor) deletion in myeloid cells limits atherosclerosis-Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018 ; 38 : 114-9.

## NOUVELLE

### « Avoir deux poids et deux mesures » mais surtout comprendre la temporalité : démence et indice de masse corporelle

Claudine Berr

> L'expression française dont les origines remontent au XVIII<sup>e</sup> siècle « Avoir deux poids et deux mesures » exprime le fait de juger différemment une même chose selon les personnes, les circonstances et les intérêts. Elle renvoie à des procédés de jugement différents envers quelqu'un ou quelque chose, et selon des règles différentes. Elle trouve une illustration récente avec la publication de Mika Kivimaki dans la revue *Alzheimer's & dementia* sur les relations entre indice de masse corporelle (IMC) et risque de démence [1].

L'indice de masse corporelle permet d'évaluer la corpulence des personnes et est calculé par le rapport du poids sur le carré de la taille. Les prévalences de surpoids et d'obésité sont élevées en France, même si ce phénomène est moins marqué que dans d'autres pays. Dans la cohorte Constances<sup>1</sup>, les prévalences estimées de surpoids en 2013

<sup>1</sup> Constances est une grande cohorte épidémiologique constituée d'un échantillon représentatif de 200 000 adultes consultant des Centres d'examen de santé (CES) de la Sécurité sociale.

Inserm Unité 1061, Neuropsychiatrie-recherche épidémiologique et clinique ; Université de Montpellier, Hôpital La Colombière, 34093 Montpellier, France. [claudine.berr@inserm.fr](mailto:claudine.berr@inserm.fr)

dans une population âgée de 30 à 60 ans étaient élevées, 41 % chez les hommes et 25 % chez les femmes ; la prévalence de l'obésité était, quant à elle, d'environ 16 %, similaire dans les deux sexes [2]. La démence est caractérisée par l'apparition progressive de déficits cognitifs multiples, incluant le plus souvent, une altération de la mémoire, et associant des troubles comportementaux, qui évoluent vers une perte progressive d'autonomie. Chez le sujet âgé, la principale cause de démence est la maladie