

L'invalidation du gène *Card9* chez la souris favorise l'athérosclérose par un défaut d'autophagie dans les macrophages de la paroi vasculaire

Marie Vandestienne, Yujiao Zhang, Hafid Ait-Oufella

Université Paris Cité, Inserm,
Paris centre de recherche cardiovasculaire (PARCC), Paris,
France.

hafid.aitoufella@inserm.fr

> L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de gros et moyen calibre provoquée par l'infiltration et l'accumulation progressives de lipoprotéines de basse densité (LDL cholestérol) dans l'espace sous-endothélial [1]. Les lipides, une fois oxydés au contact de la matrice extracellulaire, induisent l'activation de l'endothélium et le recrutement local des leucocytes circulants, et plus particulièrement des monocytes [2]. Ces monocytes se différencient, dans l'intima de la paroi artérielle¹, en macrophages, qui expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires comme les récepteurs de type *Toll-like* (TLR), la lectine 1, ou les récepteurs « éboueurs » (*scavengers*) tels que la molécule CD36, et sont ainsi capables de reconnaître les LDL oxydées et de phagocytter les cellules apoptotiques [3]. La reconnaissance des LDL oxydées dans la paroi vasculaire par la molécule CD36 et leur internalisation par les macrophages entraînent l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires et la transformation de ces macrophages en cellules spumeuses, chargées en gouttelettes lipidiques [4]. Une surcharge lipidique trop importante peut déclencher la mort cellulaire pro-

grammée (apoptose). Lorsque l'élimination des cellules apoptotiques n'est pas optimale, les débris cellulaires et les cristaux de cholestérol s'accumulent et s'organisent en un noyau nécrotique, qui favorise la progression et les complications de l'athérosclérose [5]. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation des macrophages et leur transformation en cellules spumeuses sont encore imparfaitement compris.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de la protéine CARD9 (*caspase recruitment-domain-containing protein 9*) dans le développement de l'athérosclérose chez la souris. CARD9 est une protéine adaptatrice, présente dans les macrophages et les cellules dendritiques, qui permet l'intégration des signaux en aval des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires, et qui joue un rôle critique dans la modulation des réactions inflammatoires. CARD9 est impliquée dans la production de cytokines et dans la polarisation des lymphocytes T de type Th17 [6]. Le rôle de CARD9 dans la modulation de la réponse immunitaire diffère selon le contexte et le modèle expérimental, et deux études ont précédemment rapporté des résultats contradictoires quant au rôle de CARD9 dans le développement de l'athérosclérose [7, 8].

Nous avons d'abord étudié l'expression de CARD9 par les cellules immunitaires présentes dans les plaques d'athérome

de souris par analyse transcriptomique et par immunofluorescence. Ces analyses ont révélé que CARD9 est présente dans les macrophages de l'intima à des stades précoces et tardifs du développement de la maladie vasculaire [9]. Afin d'évaluer le rôle de CARD9 dans le développement de l'athérosclérose, nous avons utilisé un modèle de souris sensibles à l'athérosclérose et génétiquement déficientes pour CARD9 (souris *Apoe^{-/-} Card9^{-/-}*). Après six semaines de régime alimentaire riche en cholestérol, ces souris développent des lésions d'athérosclérose plus importantes que les souris témoins (*Apoe^{-/-} Card9^{+/+}*), avec une augmentation du contenu des plaques athéromateuses en macrophages et un noyau nécrotique plus volumineux [9]. CARD9 étant un puissant modulateur de la production de cytokines et de la polarisation des lymphocytes T, nous avons ensuite stimulé *in vitro* des cellules de la rate des souris *Apoe^{-/-} Card9^{-/-}* et *Apoe^{-/-} Card9^{+/+}* pour évaluer l'impact de la déficience en CARD9 sur la réponse inflammatoire globale. Les cellules de la rate déficientes en CARD9 produisent moins de TNF- α (*tumor necrosis factor α*) que les souris témoins, sans différence de production d'interleukine-10 et d'interleukine-1 β [9]. Afin d'étudier spécifiquement le rôle de CARD9 d'origine hématopoïétique, nous avons transplanté de la moelle osseuse provenant de souris *Card9^{-/-}* ou *Card9^{+/+}* chez des souris *Ldlr^{-/-}* préalablement

¹ La paroi des artères et des veines est composée de trois tuniques dénommées, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice. L'intima est constituée de l'endothélium, un épithélium de revêtement simple (i.e., constitué d'une seule couche de cellules) reposant sur la lame basale, ainsi que de son tissu conjonctif sous-jacent.



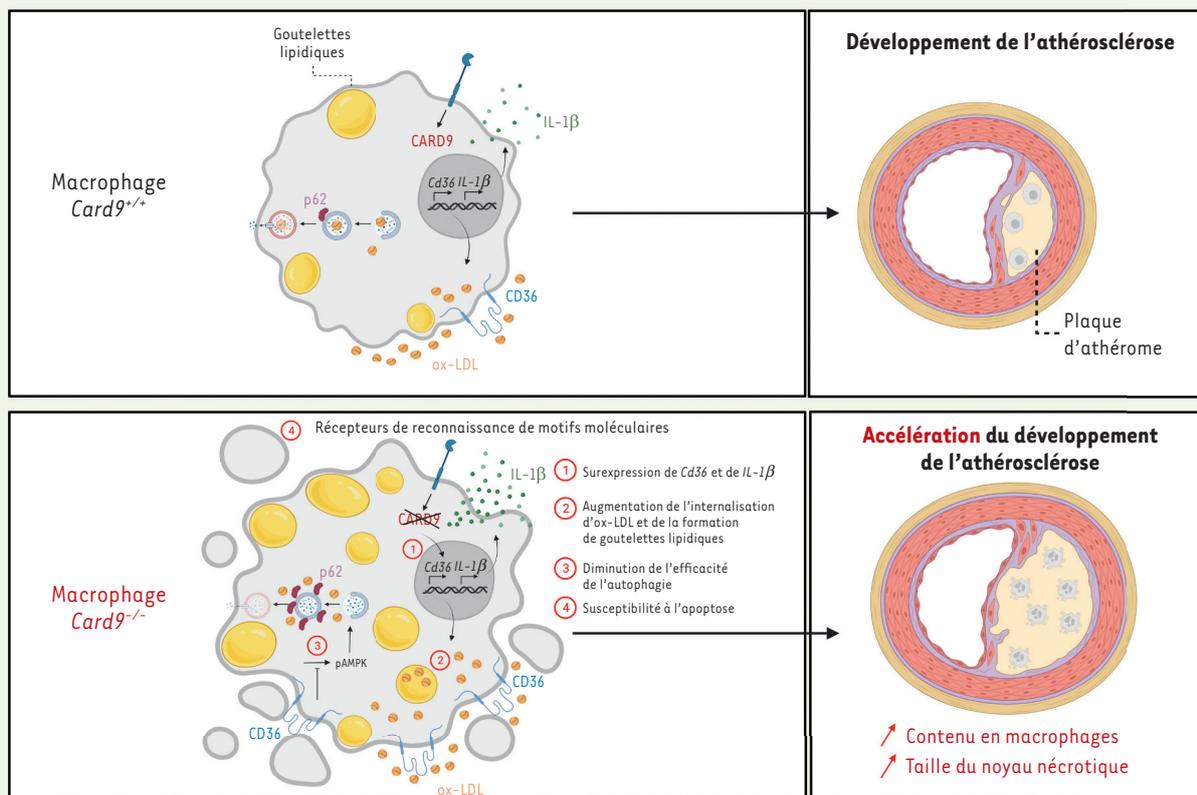


Figure 1. Schéma résumant les effets pro-athérogènes de la déficience en CARD9. Ox-LDL : lipoprotéines de basse densité oxydées.

irradiées pour détruire leurs cellules hématopoïétiques, et les souris receveuses ont ensuite été soumises à un régime riche en cholestérol pendant huit semaines. À l'issue de cette période, malgré des taux de cholestérol plasmatique similaires, les souris chimères *Ldlr*^{-/-} *Card9*^{-/-} ont développé des plaques d'athérome plus volumineuses et plus inflammatoires que les souris chimères *Ldlr*^{-/-} *Card9*^{+/+} témoins, avec plus de macrophages dans les plaques et un corps nécrotique plus volumineux. Dans ce modèle, les cellules de rate des souris chimères *Ldlr*^{-/-} *Card9*^{-/-} stimulées *in vitro* produisent moins de TNF-α, mais également moins d'interleukine-10 et d'interleukine-1β que les cellules de la rate des souris témoins [9]. Étant donné l'implication de CARD9 dans la polarisation lymphocytaire T, nous avons ensuite généré des souris *Apoe*^{-/-} *Rag2*^{-/-} *Card9*^{-/-}, dépourvues de

lymphocytes T, B, et de cellules *natural killer* (NK), et soumis ces souris à un régime riche en cholestérol pendant six semaines. Comme précédemment, la déficience en CARD9 dans ce modèle est associée à une aggravation des lésions athéromateuses [9], ce qui suggère que la réponse immunitaire adaptative n'est pas impliquée dans l'accélération de l'athérosclérose observée chez les souris déficientes en CARD9.

Le phénotype lésionnel des souris déficientes en CARD9 est caractérisé par une augmentation de la taille du noyau nécrotique de la plaque athéromateuse. Dans la mesure où la formation du noyau nécrotique est liée à l'accumulation intracellulaire de lipides, nous avons ensuite évalué la capacité des macrophages *Apoe*^{-/-} *Card9*^{-/-} à internaliser les lipides oxydés *in vitro*. L'absence de CARD9 entraîne une augmentation de l'endocytose lipidique et du nombre de

cellules spumeuses après stimulation par les LDL oxydées. L'analyse transcriptomique et par immunofluorescence des macrophages *Apoe*^{-/-} *Card9*^{-/-} exposés aux LDL oxydées a révélé une augmentation significative de l'expression de CD36. La déficience en CARD9 induit une modification phénotypique des macrophages vers un profil plus inflammatoire, avec une production accrue d'interleukine-1β et une moindre production d'interleukine-10 après stimulation *in vitro*. De plus, les macrophages *Apoe*^{-/-} *Card9*^{-/-} sont plus enclins à l'apoptose que les macrophages témoins *Apoe*^{-/-} *Card9*^{+/+} après exposition aux LDL oxydées (ox-LDL) *in vitro*, et également *in vivo* dans les plaques d'athérome [9]. Pour tenter de comprendre cette susceptibilité accrue des macrophages à la mort cellulaire en l'absence de CARD9, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de l'autophagie, un méca-



nisme intracellulaire de dégradation et de recyclage de composés cellulaires impliquant les lysosomes, qui peut être sollicité physiologiquement ou utilisé par les cellules comme un mécanisme compensateur en cas de stress métabolique. Un défaut d'autophagie peut entraîner l'accumulation de matériel endommagé dans le cytoplasme et provoquer un stress cellulaire pro-apoptotique. La machinerie d'autophagie est une machinerie dynamique complexe, dont le dysfonctionnement s'accompagne d'une accumulation intracellulaire de la protéine p62. CD36, qui est surexprimé chez les souris déficientes pour CARD9, a précédemment été impliqué dans la régulation de l'autophagie via une cascade de signalisation dépendante de la protéine AMPK (*AMP-activated protein kinase*) [10]. Afin d'évaluer l'implication du flux autophagique dans l'effet pro-athérogène de la déficience en CARD9, nous avons utilisé différentes approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*. En culture cellulaire, nous avons mis en évidence une diminution de la phosphorylation de AMPK associée à une accumulation intracellulaire de p62 dans les macrophages *ApoE^{-/-} Card9^{-/-}*, une accumulation majorée par une exposition des cellules aux LDL oxydées. *In vivo*, les plaques d'athérome contiennent plus de macrophages MOMA⁺ (*anti-macrophage/monocyte monoclonal antibody*) p62⁺ chez les souris *ApoE^{-/-} Card9^{-/-}* que chez les souris témoins. De plus, deux traitements pharmacologiques activa-

teurs du flux autophagique (metformine et rapamycine) ont permis d'abolir l'accumulation intracellulaire de p62 et de corriger l'accélération de l'athérosclérose chez les souris déficientes en CARD9. La surexpression du récepteur CD36 induite par la déficience en CARD9 constitue un mécanisme clé pour l'effet pro-athérogène de cette déficience, car cet effet disparaît en l'absence de CD36 : les phénotypes vasculaire et inflammatoire des souris *Ldlr^{-/-} Cd36^{-/-} Card9^{-/-}* et *Ldlr^{-/-} Cd36^{-/-} Card9^{+/+}* sont en effet similaires [9]. Enfin, pour évaluer la pertinence médicale de ces résultats expérimentaux, nous avons analysé des monocytes humains de patients ayant une mutation « perte de fonction » de CARD9, et avons confirmé que la déficience en CARD9 affecte la production de cytokines pro-inflammatoires, la susceptibilité de ces cellules à l'apoptose et la signature transcriptomique associée à l'athérosclérose. CARD9 est présent dans les plaques athéromateuses humaines, où la protéine est colocalisée avec les macrophages dans les zones riches en lipides qui entourent le corps nécrotique [9].

En conclusion, nous avons montré que l'absence de CARD9 induit une accélération de l'athérosclérose chez la souris, avec une augmentation de l'infiltration des macrophages dans la plaque athéromateuse et de la taille du corps nécrotique. Cet effet pro-athérogène est lié à un défaut d'autophagie, dépendant de CD36, dans les macrophages (Figure 1),

et disparaît si on traite les souris par la rapamycine ou la metformine, deux activateurs du flux autophagique [9]. ♦

Genetic inhibition of CARD9 in mice accelerates the development of atherosclerosis through CD36-dependent defective autophagy

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011; 145 : 341-55.
- Potteaux S, Ait-Oufella H, Mallat Z. Role of splenic monocytes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015; 26 : 457-63.
- Koelwyn GJ, Corr EM, Erbay E, et al. Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2018; 19 : 526-37.
- Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, et al. Scavenger receptors class A-1/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277 : 49982-8.
- Van Vré EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, et al. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32 : 887-93.
- Ruland J. CARD9 signaling in the innate immune response. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1143 : 35-44.
- Thiem K, Hoeke G, van den Berg S, et al. Deletion of hematopoietic dectin-2 or CARD9 does not protect against atherosclerotic plaque formation in hyperlipidemic mice. *Sci Rep* 2019; 9 : 4337.
- Thiem K, Hoeke G, Zhou E, et al. Deletion of hematopoietic dectin-2 or CARD9 does not protect from atherosclerosis development under hyperglycaemic conditions. *Diab Vasc Dis Res* 2019; 17 : 1479164119892140.
- Zhang Y, Vandestienne M, Lavillegrand J-R, et al. Genetic inhibition of CARD9 accelerates the development of atherosclerosis in mice through CD36 dependent-defective autophagy. *Nat Commun* 2023; 14 : 4622.
- Li Y, Yang P, Zhao L, et al. CD36 plays a negative role in the regulation of lipophagy in hepatocytes through an AMPK-dependent pathway. *J Lipid Res* 2019; 60 : 844-55.



Tarifs d'abonnement m/s - 2023

Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Abonnez-vous sur

www.medecinesciences.org

