

Les protéines PGRP, un chaînon manquant de l'immunité innée de la drosophile

Les micro-organismes ont depuis fort longtemps colonisé l'ensemble des niches écologiques du globe. Impliqués dans de nombreux processus biologiques, ils sont essentiels à la vie de tout organisme. La cohabitation entre les microbes et les autres formes vivantes se passe le plus souvent sans dommage et peut être mutuellement profitable comme dans le cas des interactions symbiotiques. Certaines espèces de micro-organismes sont pathogènes et peuvent induire des dérèglements biologiques importants chez l'hôte infecté et, dans certains cas, provoquer sa mort. Le maintien d'une certaine harmonie dans le monde vivant nécessite donc un équilibre entre les organismes qui cherchent à se protéger des agents infectieux et les microbes qui tentent de contourner les défenses de l'hôte. Confrontées aux mêmes grands groupes de micro-organismes (bactéries, virus, champignons, levures...), les espèces animales et végétales ont développé, au cours de l'évolution, des systèmes de défense qui leur sont propres. Si les mécanismes moléculaires mis en œuvre diffèrent, les buts à atteindre sont les mêmes. L'organisme hôte doit identifier l'agresseur, puis le neutraliser.

Les organismes unicellulaires n'ont pour se défendre que la phagocytose de l'envahisseur et sa destruction par des enzymes intracellulaires. Cette simplicité relative contraste avec l'extraordinaire complexité du système immunitaire des vertébrés qui a la propriété de pouvoir adapter sa réponse à la nature du micro-organisme infectieux. Fondée sur la diversité moléculaire des immunoglobulines et des récepteurs des lymphocytes T, cette immunité dite adaptative n'est fonctionnelle

que quelques jours, voire quelques semaines après l'infection. Entre temps, l'infection a été combattue par l'immunité innée qui bien que moins spécifique, est néanmoins très efficace. Elle fait intervenir la phagocytose, les réactions inflammatoires avec la production de cytokines et l'activation du complément [1].

Les invertébrés en général et les insectes en particulier ne disposent pour se défendre que de la réponse immunitaire innée. L'ancienneté évolutive et l'extraordinaire diversité des insectes témoignent de l'efficacité de ce type d'immunité. Comme ce fut le cas pour de nombreux processus biologiques et en particulier pour l'étude du développement, la drosophile (littéralement « qui aime la rosée »), mouche du vinaigre pour les non initiés et mouche des fruits pour les Anglo-Saxons, s'est révélée être un modèle de choix pour disséquer les mécanismes moléculaires de l'immunité des invertébrés. Nous évoquerons ici des résultats récents qui permettent de mieux appréhender la phase de reconnaissance des micro-organismes lors de leur pénétration dans l'organisme.

Dépourvus des gènes codant pour les anticorps, les insectes luttent contre les agents infectieux à l'aide de peptides dont la taille varie de 20 à 50 acides aminés [2]. Regroupés en sous-familles en fonction des micro-organismes contre lesquels ils sont actifs, les peptides antimicrobiens sont synthétisés par les cellules du corps gras et déversés dans l'hémolymphe à la suite d'une infection. Chez la drosophile, deux voies de signalisation indépendantes régulent la synthèse de la totalité des peptides antimicrobiens [3]. La voie *Imd* contrôle la production des peptides

dirigés contre les bactéries à Gram négatif alors que la voie *Toll* joue un rôle central dans la réponse contre les bactéries à Gram positif et les champignons [4, 5]. Découverte pour son rôle dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale de l'embryon, la voie *Toll* est bien caractérisée au niveau moléculaire [6]. Le ligand Spätzle (Spz) est présent à l'état de précurseur immature dans l'espace périvitellin qui entoure l'embryon. L'activation d'une cascade de protéases extracellulaires provoque le clivage protéolytique de Spz et engendre un ligand actif capable de provoquer la dimérisation du récepteur transmembranaire Toll. Cette activation déclenche des réactions cytoplasmiques dont la conséquence ultime est la translocation nucléaire du facteur de transcription Dif, un membre de la famille Rel/NF- κ B [7] (figure 1). Les drosophiles porteuses de mutations dans un des composants de la voie *Toll* présentent une sensibilité très prononcée pour les champignons ou les bactéries à Gram positif [2]. Ce phénotype s'accompagne d'une incapacité à produire certains peptides antimicrobiens. La voie *Toll* est donc impliquée dans deux fonctions totalement distinctes : la mise en place de l'axe dorso-ventral pendant l'embryogenèse et la réponse immunitaire chez l'adulte.

Si les composants intracellulaires des cascades de signalisation *Toll* et *Imd* sont aujourd'hui bien caractérisés, les protéines en amont de ces voies et plus particulièrement les molécules de reconnaissance des micro-organismes restent à découvrir. L'identification de ces protéines est particulièrement attendue pour la voie *Toll* qui peut être activée par deux types de micro-organismes très différents, les

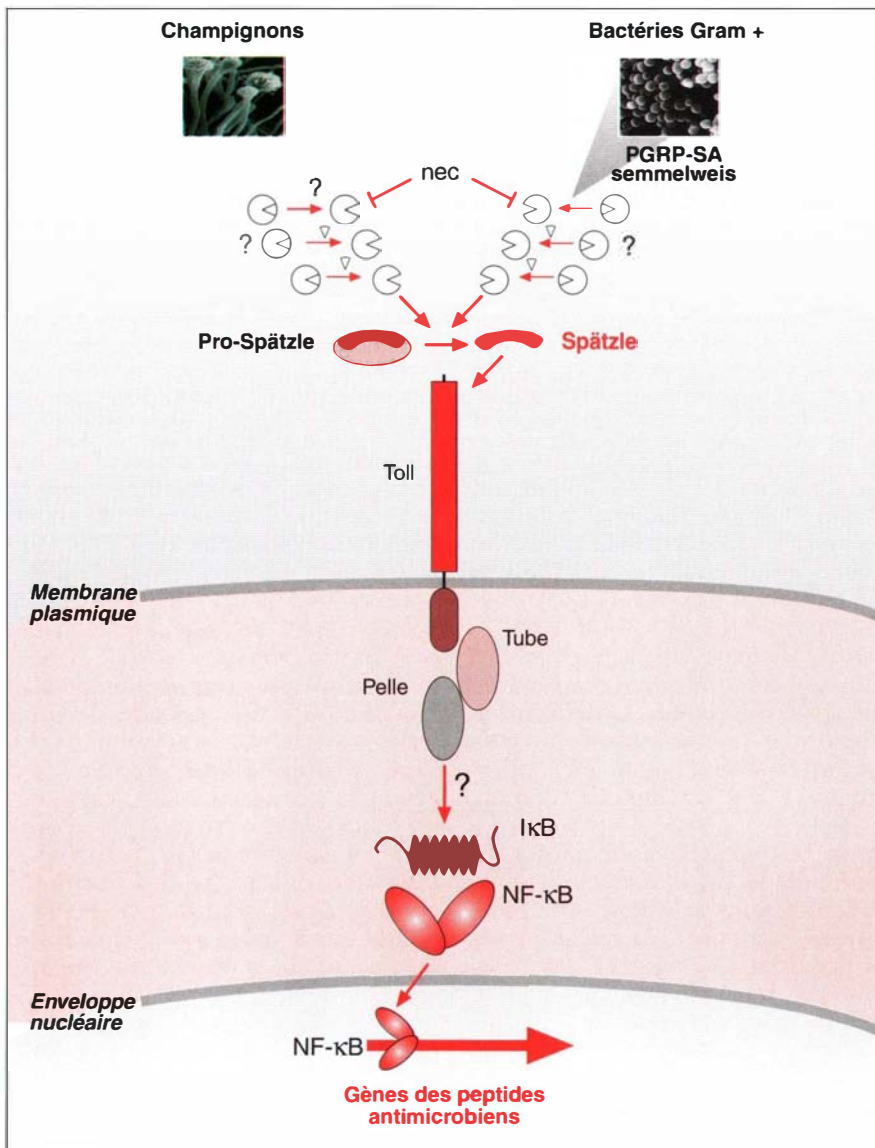


Figure 1. **Implication de la voie Toll dans la réponse immunitaire de la drosophile.** Cette voie de signalisation peut être activée par deux micro-organismes, les bactéries à Gram positif et les champignons. La protéine PGRP-SA/semmelweis est essentielle à la reconnaissance des bactéries à Gram positif lors de leur entrée dans l'organisme. Cette protéine ne joue aucun rôle dans la réponse antifongique. La nature des protéases situées entre la PGRP-SA et Spz reste à découvrir. Aucune des protéines en amont de Spz dans la réponse antifongique n'a encore été identifiée. Lors de son activation par Spz, Toll induit l'expression des peptides antimicrobiens dans les cellules du corps gras via la translocation nucléaire d'une molécule de type NF-κB

bactéries à Gram positif et les champignons. Avant de développer les éclairages récents acquis chez la drosophile, voyons comment cette étape de reconnaissance s'effectue chez les vertébrés. Les travaux sur la reconnaissance du non-soi ont été forte-

ment influencés par une hypothèse proposée en 1989 par le professeur Charles Janeway, de l'Université de Yale [8]. Dans un article qui fait aujourd'hui référence, Janeway propose qu'au cours de l'évolution la nature a sélectionné des récepteurs

moléculaires qui reconnaissent des motifs invariants présents sur les microbes et absents des cellules de l'hôte. Ces motifs structuraux qu'il appelle «PAMP» (pour *pathogen associated molecular pattern*), correspondent aux lipopolysaccharides (LPS) des parois des bactéries à Gram négatif, aux peptidoglycanes (PGN) des bactéries à Gram positif ou encore aux mannanes des champignons. Les PAMP seraient indispensables à la survie des micro-organismes et serviraient de ligands pour des récepteurs spécifiques (appelé PRR pour *pattern recognition receptor*) présents à la surface des cellules du système immunitaire.

Les premiers éléments d'information sur la nature moléculaire des PRR de vertébrés proviennent d'études faites sur les souris *lps*. Ces souches mutantes présentent la caractéristique d'être insensibles aux injections de LPS [9]. Ce traitement, lorsqu'il est appliqué à des souris sauvages provoque la mort rapide des animaux par choc septique. Par clonage positionnel, il a été démontré que le gène inactivé par la mutation *lps* est *Toll-Like-Receptor 4 (TLR4)*, un homologue humain des gènes *Toll* de la drosophile [9]. Ce résultat essentiel démontre que les mécanismes moléculaires qui règlent l'immunité innée chez les mammifères et chez les invertébrés présentent d'étonnantes similitudes. La famille des TLR comprend au minimum 10 membres dont plusieurs sont activés par un ou plusieurs PAMP [10]. TLR2 répond aux peptidoglycanes des bactéries à Gram positif, TLR5 est associé à la reconnaissance de la flagelline des bactéries, TLR9 à l'ADN non méthylé des bactéries et, des travaux récents impliquent TLR3 dans la reconnaissance de l'ARN double brins des virus [11-14] (figure 2). Pris dans leur ensemble, ces travaux suggèrent que, chez les mammifères, les membres de la famille des TLR agissent comme autant de PRR. Des études biochimiques plus poussées pour TLR2, 3, 5 et 9 seront sans doute nécessaires pour asseoir cette théorie et démontrer une interaction moléculaire entre les TLR 2, 3, 5 et 9 et les PAMP. Les résultats obtenus récemment indiquent que l'étape de reconnais-

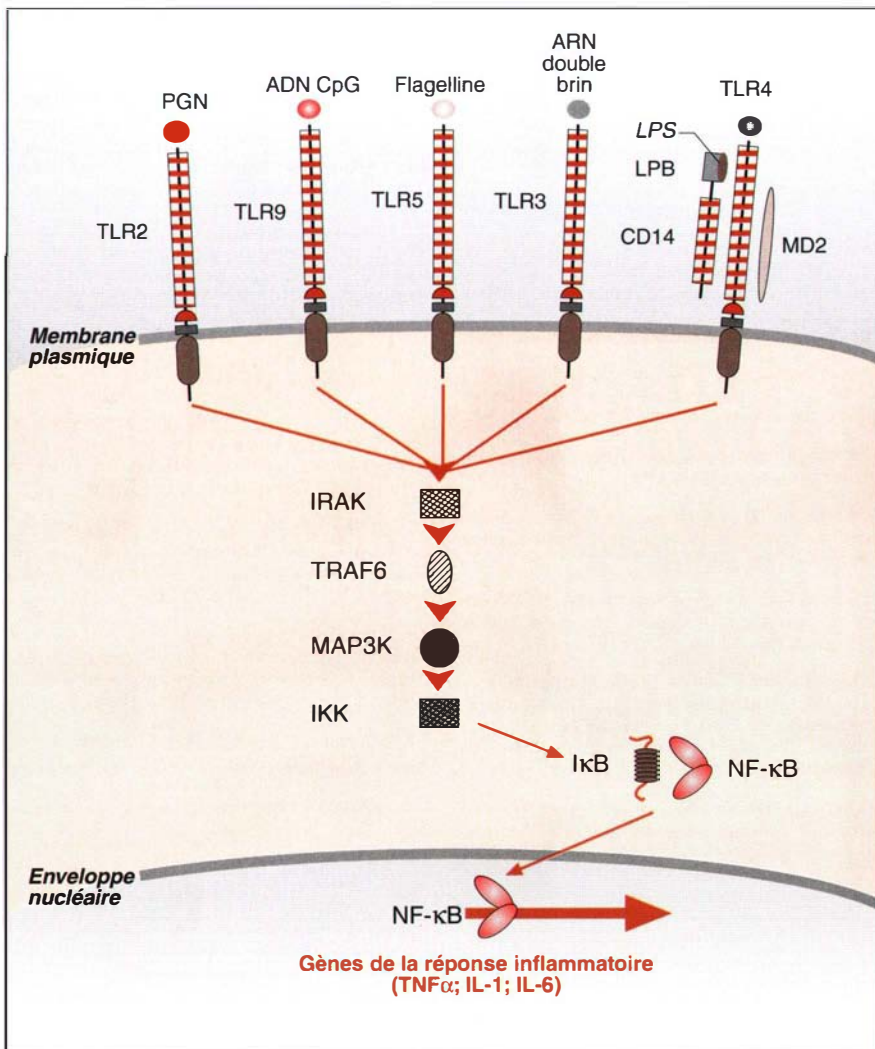


Figure 2. **Rôle des molécules TLR dans la réponse immunitaire des mammifères.** Exprimés à la surface des cellules immunocompétentes, les membres de la famille des TLR peuvent être activés par des motifs structuraux très variés et présents à la surface des micro-organismes. L'activation des récepteurs déclenche une cascade de signalisation qui fait intervenir, entre autre, les composants du signalosome et les protéines NF-κB/IκB. La conséquence de cette activation est la production, par les cellules, de cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire. Dans le cas de TLR4, une interaction moléculaire directe a été proposée entre le LPS et un complexe protéique formé de TLR4, MD-2, LBP et CD14.

sance des agents infectieux fait intervenir, chez la drosophile, des mécanismes distincts de ceux décrits chez les mammifères (figure 1). Lors de la réponse immunitaire, le récepteur Toll est activé par le ligand Spz, une molécule appartenant à la famille des protéines à nœud de cystéine qui comprend aussi le NGF (nerve growth factor) et le TGFβ (transforming growth

factor β) [15]. Par ailleurs, une mutation perte de fonction dans un gène codant pour une serpine (nec) provoque une activation constitutive de la voie Toll. Ce résultat indique que, comme lors de l'embryogenèse, Spz est mûri par clivage protéolytique lors de la réponse immunitaire de l'adulte [16]. Si le récepteur Toll de drosophile ne reconnaît pas directe-

ment les motifs structuraux des micro-organismes, quelles sont alors les protéines qui assurent cette fonction chez les insectes ? En recherchant des mutations qui affectent l'inductibilité des peptides antimicrobiens de la drosophile, nous avons isolé une mutation dans le gène codant pour la *peptidoglycan recognition protein* (PGRP-SA) [17]. Cette molécule appartient à une famille de 12 protéines capables de lier *in vitro* le peptidoglycane, un constituant majeur de la paroi des bactéries à Gram positif [18]. Cette mutation a été appelée *semmelweis* (*seml*) en l'honneur du médecin hongrois à l'origine de la découverte de la cause de la fièvre puerpérale [19]. En l'absence de protéine PGRP-SA fonctionnelle, la réponse de la drosophile aux bactéries à Gram positif est fortement altérée. Cela se traduit par une incapacité de synthétiser les peptides antimicrobiens et surtout par une grande sensibilité aux infections par les bactéries à Gram positif. Cette déficience est très spécifique dans la mesure où la réponse aux bactéries à Gram négatif reste normale dans les mutants *seml*. Les phénotypes observés pour les drosophiles *seml* sont identiques à ceux décrits pour les mutants *Dif* ou *Spz*, suggérant que *seml* est un nouveau composant de la voie Toll. Des expériences d'épistasie génétique ont démontré que *seml* code pour une protéine qui agit en amont du récepteur Toll et de la serpine nec. Le sauvetage du mutant *seml* par transfert d'hémolymphe de drosophile sauvage a confirmé que la protéine Seml est circulante dans le sang de l'insecte [17]. Nous pensons donc qu'après avoir franchi la barrière cuticulaire, les bactéries à Gram positif sont reconnues par le PGRP circulant. La liaison du PGRP de la drosophile avec le PGN des bactéries conduirait à l'activation de la voie Toll par un mécanisme encore inconnu. Se pose alors la question de l'effet de la mutation *seml* sur la réponse antifongique. Les résultats obtenus indiquent que contrairement aux autres mutants de la voie Toll, *seml* n'est sensible qu'aux bactéries à Gram positif. Alors que les mutants Toll, *Spz* ou *Dif* meurent très rapidement d'une infection par les

champignons, le mutant *seml* se comporte, vis-à-vis de ce pathogène, comme les drosophiles sauvages [17]. Ces résultats indiquent que les champignons et les bactéries à Gram positif sont reconnus par des protéines différentes même si ils activent la même voie de signalisation intracellulaire. En conclusion, nos études apportent la première démonstration fonctionnelle *in vivo* du rôle d'une molécule de reconnaissance des micro-organismes dans la réponse immune des invertébrés. Ces résultats confirment que, contrairement aux vertébrés, le récepteur *Toll* est incapable de directement reconnaître des motifs présents à la surface des pathogènes. Enfin, il apparaît clairement que les bactéries à Gram positif et les champignons empruntent des chemins moléculaires différents pour activer le même récepteur transmembranaire *Toll*. Il reste à déterminer la nature des molécules activées par le PGRP qui conduisent au clivage de *Spz* et la nature des PRR pour les bactéries à Gram négatif et les champignons. Le génome de la drosophile contient de multiples gènes candidats et il sera nécessaire d'en obtenir des formes mutantes afin de pouvoir étudier leur fonction. Notons enfin que des gènes homologues des PGRP existent dans le génome des vertébrés [20]. L'inactivation fonctionnelle de ces gènes devrait permettre d'étudier leur implication éventuelle dans la réponse immunitaire et leur lien avec les molécules TLR ■

Julien Royet

Université Louis-Pasteur, IBMC, Cnrs UPR 9022,

Réponse immunitaire et développement chez les insectes,
15, rue René-Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

J.Royet@ibmc.u-strasbg.fr

RÉFÉRENCES

- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-8.
- Bulet P. Les peptides antimicrobiens de la drosophile. *Med Sci* 1999; 15: 23-9.
- Lemaitre B. La drosophile: un modèle pour l'étude de la réponse immunitaire innée. *Med Sci* 1999; 15: 15-22.
- Khush R S, Leulier F, Lemaitre B. Drosophila immunity: two paths to NF-kappaB. *Trends Immunol* 2001; 22: 260-4.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
- Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 393-416.
- Reichhart JM, Imler JL. Toll story. *Med Sci* 2000; 12: 1439-41.
- Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54: 1-13.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282: 2085-88.
- Medzhitov R. Tolls. *Curr Biol* 2001; 11: 19-25.
- Mitsuzawa H, Wada I, Sano H, et al. Extracellular Toll-like receptor 2 region containing Ser40-Ile64 but not Cys30-Ser39 is critical for the recognition of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan. *J Biol Chem* 2001; 276: 41350-6
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-103
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-8
- Mizuguchi K, Parker JS, Blundell TL, Gay NJ. Getting knotted: a model for the structure and activation of Spatzle. *Trends Biochem Sci* 1998; 23: 239-42.
- Levashina EA, Langley E, Green C, et al. Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science* 1999; 285: 1917-19.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann J, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria via a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 2001; 414: 756-9.
- Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10078-82.
- Céline LF. Semmelweis. L'imaginaire. Paris: Gallimard, 1999.
- Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 2001; 276: 34686-94.

Appel à communications

■ Journées Scientifiques ■

Forum LABO 2002 & Forum LABO BIOTECH

Recherche Développement Contrôle Sécurité

CIFL

Comité Interprofessionnel des Fournisseurs du Laboratoire

www.forumlabo.com

MCI

Manifestations & Communications Internationales

19, rue d'Athènes - 75009 Paris - France

Tél. : (33) 01 44 53 72 20 - Fax : (33) 01 44 53 72 22 - e-mail : congre@mci-salons.fr

26 au 29 mars 2002 • CNIT • Paris-La Défense