

Apoptose, interleukine-1 et shigellose

Shigella est une bactérie à Gram négatif de la famille des entérobactéries responsable de la dysenterie bacillaire ou shigellose, une diarrhée sanglante secondaire à la destruction de la muqueuse du côlon due à la propriété de ce pathogène d'envahir cellules et tissu coliques. La shigellose est une cause importante de morbidité et de mortalité chez les jeunes enfants dans les régions tropicales, en particulier dans les contrées sous-développées où l'insuffisance de l'hygiène individuelle et des installations sanitaires rend compte d'une transmission interhumaine très efficace. *Shigella* représente aussi un très intéressant modèle de subversion et d'invasion d'une barrière muqueuse et est, à ce compte, fort étudiée comme modèle de dialogue cellule procaryote-cellule eucaryote [1].

Il est maintenant clair que *Shigella* passe la barrière intestinale essentiellement à travers les cellules M [2-4]. Ces cellules épithéliales spécialisées assurent la translocation de particules depuis la lumière intestinale vers les espaces sous-épithéliaux, en particulier le dôme des follicules lymphoïdes solitaires associés à la muqueuse recto-colique. Ces structures représentent la composante inductrice de l'immunité de la muqueuse intestinale. D'autres pathogènes entériques font effraction au niveau de la muqueuse de l'hôte en utilisant la même voie. C'est le cas des *Salmonella*, des *Yersinia*, des reovirus et des rotavirus [5].

Une fois présentes au sein du dôme des follicules lymphoïdes, les shigelles entrent en contact avec les cellules immunitaires, en particulier les macrophages résidents. Les bactéries atteignent secondairement les cellules épithéliales au sein desquelles elles prolifèrent, causant ainsi des dégâts sévères au niveau de la muqueuse colique. De plus, la présence de la bactérie déclenche une réaction in-

flammatoire très sévère qui, au prix d'une destruction de la muqueuse, assure l'éradication du pathogène. Cette réaction inflammatoire est en réalité cause et conséquence du processus invasif, car elle déstabilise considérablement l'épithélium intestinal et en facilite l'invasion par les bactéries encore luminales [3].

Nous commençons à comprendre les bases moléculaires de l'invasion des cellules épithéliales par *Shigella*. Ce pathogène peut se faire ingérer par des cellules qui ne sont pas des phagocytes professionnels grâce à l'induction d'une réorganisation massive du cytosquelette cellulaire donnant lieu à des ondulations membranaires qui aboutissent à un processus de macropinocytose [6]. L'étape suivante est la lyse de la vacuole de phagocytose qui entoure la bactérie [7]. Cet échappement est, à plusieurs égards, une étape clé du développement de l'infection, y compris pour ce qui concerne les processus d'induction de mort cellulaire qui vont être considérés ici.

Il existe deux formes de mort cellulaire, la nécrose et l'apoptose. La nécrose est un processus passif survenant par exemple après un stress physique comme une altération de la membrane cellulaire. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, nécessite une participation active de la cellule dans le déclenchement de sa propre mort. La mise en route de ce processus de « sabordage » cellulaire implique l'induction d'un programme génétique en réponse à un stimulus spécifique. Ces deux types de mort cellulaire peuvent être distingués sur la base de différences ultrastructurales [8-10]. Durant la nécrose, le cytoplasme cellulaire semble se désintégrer, les organites cellulaires ne sont plus reconnaissables, alors que le noyau conserve pour un temps un aspect normal. Inversement, au cours de l'apoptose, le cytoplasme se

remplit de nombreuses vacuoles et le noyau montre une intense condensation périphérique de la chromatine. La mort cellulaire programmée se caractérise par la fragmentation de l'ADN cellulaire en multimères de 200 pb, la taille d'un nucléosome.

Il avait été depuis longtemps montré qu'existait une importante différence de comportement des macrophages comparés à d'autres cellules en présence de *Shigella* [11]. En effet, alors que les cellules épithéliales sont assez longtemps capables de supporter la croissance intracellulaire de *Shigella*, les macrophages, eux, meurent très rapidement après invasion. Ce comportement vient d'être éclairci après démonstration que *Shigella flexneri* était capable d'induire l'apoptose des macrophages infectés [12]. En microscopie électronique, la chromatine nucléaire des cellules infectées apparaît très condensée à la périphérie nucléaire, le cytoplasme est vacuolisé, la membrane cytoplasmique est le siège de nombreuses invaginations en forme de puits. Les macrophages infectés par une bactérie non invasive ne présentent aucune altération significative. Confirmation du processus d'apoptose est apportée par la démonstration de la fragmentation de l'ADN nucléaire uniquement en cas d'infection des macrophages par des bactéries invasives.

L'induction de l'apoptose des macrophages par une bactérie invasive est un paradoxe dans la mesure où ces cellules représentent la première ligne de défense cellulaire anti-infectieuse et la première source de cytokines pro-inflammatoires. Un tel processus est donc *a priori* incompatible avec ce qui a été dit plus haut de la physiopathologie de la shigellose.

En réponse à une variété de stimuli, le macrophage exprime trois des plus importantes cytokines pro-inflammatoires : IL1, TNF α et IL6. Les gènes de ces deux dernières sont transcrits,

les messages sont traduits et les cytokines sont sécrétées dès que la cellule est stimulée, alors que l'IL1 s'accumule dans le cytosol. Il existe deux formes d'IL1, IL1 α et IL1 β . Ces deux formes partagent le même récepteur et ont des activités biologiques indistinguables. Toutes deux sont synthétisées sous la forme d'un précurseur de 35 kDa qui est ensuite clivé par des protéases spécifiques en une forme mûre de 17,5 kDa. Les deux formes de l'IL1 α sont biologiquement actives alors que seule la forme clivée de l'IL1 β l'est. Les formes non clivées sont synthétisées et s'accumulent dans le cytosol, les formes clivées ne sont trouvées qu'en position extracellulaire. Aucune des deux isoformes ne possède de peptide signal et ne peut donc utiliser une voie classique pour sa sécrétion [13]. Il a d'ores et déjà été montré que l'un des processus par lequel l'IL1 pourrait être sécrétée est l'induction de la mort cellulaire programmée de la cellule productrice [14].

Dans un tel contexte, l'induction de l'apoptose du macrophage infecté par un pathogène pourrait représenter un mode extrêmement efficace de libération de son *pool* d'IL1. La sécrétion des principales cytokines inflammatoires a été étudiée dans des macrophages péritonéaux préstimulés par du LPS puis infectés par *Shigella flexneri*. De telles cellules contiennent un *pool* significatif d'IL1 et reflètent probablement l'état d'activation dans lequel doivent se trouver les macrophages intestinaux, en particulier ceux situés dans le dôme des follicules lymphoïdes associés à la muqueuse recto-colique qui sont en permanence soumis à la présence de produits de dégradation bactériens [15-19]. Comme supposé, une grande quantité d'IL1, mais non d'IL6 ni de TNF α , est sécrétée lorsque les macrophages sont infectés par une souche invasive de *Shigella flexneri*, mais pas en cas d'infection par une souche non invasive [20]. Les cinétiques de sécrétion montrent que l'IL1 apparaît dans le surnageant des macrophages dès la quinzième minute après infection et atteint son pic entre 30 et 40 minutes. Ces résultats indiquent clairement que la mort apoptotique du macrophage induite

par une bactérie invasive est capable d'induire la sécrétion d'un *pool* d'IL1 présynthétisé et donc de mettre en route une réaction inflammatoire précoce. Des expériences supplémentaires ont montré que les macrophages stimulés par du LPS devenaient anergiques et incapables de synthétiser *de novo* de nouvelles cytokines, confirmant ainsi que l'IL1 sécrétée vient bien d'un *pool* présynthétisé. Dans le surnageant des macrophages stimulés par du LPS puis infectés par *Shigella*, l'IL1 α est détectée sous sa forme précurseur alors que l'IL1 β est détectée sous sa forme mûre. Ces résultats indiquent que la libération d'IL1 survient tôt après la mise en route du programme de mort cellulaire et représente un processus actif et non une banale fuite des *pools* intracellulaires.

Un fascinant scénario émerge concernant la physiopathologie de la shigellose. Après avoir traversé la cellule M, la bactérie rencontre les macrophages présents dans le dôme du follicule lymphoïde. Ces macrophages, qui ont toute chance d'être dans un état activé, compte tenu de leur localisation, phagocytent le pathogène, ce qui enclenche le programme de mort de la cellule hôte. Outre l'intérêt pour le pathogène qui assure là sa survie, ce processus va amener la libération massive d'IL1 par ces cellules infectées, une sorte de « chant du cygne » qui engage la cascade inflammatoire que peut déclencher cette cytokine. Cette inflammation précoce, déclenchée par un nombre initialement très limité de bactéries invasives, amène une rapide déstabilisation de l'épithélium, facilitant ainsi son invasion et sa destruction. Ce schéma physiopathologique fait de la shigellose une maladie inflammatoire aiguë du côlon, assez proche de la rectocolite hémorragique, pour laquelle elle pourrait représenter un modèle. Les travaux en cours *in vivo* confirment pour l'instant ce schéma.

A.Z.
P.S.

1. Maurelli AT, Sansonetti PJ. Genetic determinants of *Shigella* pathogenicity. *Annu Rev Microbiol* 1988 ; 42 : 127-50.

2. Sansonetti P. Stratégie d'infection des cellules épithéliales par les bactéries invasives, étude du modèle *Shigella*. *médecine/sciences* 1990 ; suppl 7 : 40-6.

3. Perdomo OJJ, Cavaillon JM, Huerre M, Ohayon H, Gounon P, Sansonetti PJ. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J Exp Med* 1994 ; 180 : 1307-1319.

4. Wassef JS, Keren DF, Mailloux JL. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in rabbit intestinal loop model of shigellosis. *Infect Immunol* 1989 ; 57 : 858-63.

5. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992 ; 72 : 853-79.

6. Adam T, M Arpin, MC Prévost, Gounon P, Sansonetti PJ. Cytoskeletal rearrangements during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* 1994, sous presse.

7. Sansonetti PJ, Ryter A, Clerc P, Maurelli AT, Mounier J. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells : lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun* 1986 ; 51 : 461-9.

8. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis : mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 1991 ; 32 : 223-54.

9. Ellis RE, Yuan J, Horvitz H. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991 ; 7 : 663-98.

10. Golstein P. Morts cellulaires et système immunitaire. *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 546-53.

11. Clerc P, Ryter A, Mounier J, Sansonetti PJ. Plasmid-mediated early killing of eucaryotic cells by *Shigella flexneri* as studied by infection of J774 macrophages. *Infect Immun* 1987 ; 55 : 521-7.

12. Zychlinsky A, Prévost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* 1992 ; 358 : 167-9.

13. Dinarello CA. Role of Interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol Rev* 1992 ; 127 : 119-46.

14. Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin-1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 8485-9.

15. Soestrayo M, Biewenga J, Kraal G, Sminia T. The localization of macrophages subsets and dendritic cells in the gastrointestinal tract of the mouse with special reference to the presence of high endothelial venules. An immuno- and enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* 1990 ; 259 : 587-93.

16. Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. Localization of intestinal Interleukin-1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993 ; 104 : 749-58.

17. Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, Vaux D, Jewell DP. Macrophages subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut* 1989 ; 30 : 826-34.

18. Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of Interleukin-1 β by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989 ; 30 : 835-8.

19. Jarry A, Robaszekiewicz M, Brousse N, Potet F. Immune cells associated with M cells in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches in the rat. *Cell Tissue Res* 1989 ; 255 : 293-8.

20. Zychlinsky A, Fitting C, Cavaillon JM, Sansonetti PJ. Interleukin-1 is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. *J Clin Invest* 1994 ; 94 : 1328-32.