

## Immunité innée : deux récepteurs pour détecter l'ADN bactérien

Chez tous les vertébrés, l'invasion par des micro-organismes est initialement combattue par des mécanismes de défense innée qui préexistent chez tous les individus et sont activés dans les minutes qui suivent l'infection. Cette réponse rapide est suivie par la réponse adaptative caractérisée par l'activation de populations spécifiques de lymphocytes en quelques jours. Longtemps boudée par les immunologistes, l'immunité innée connaît depuis quelque temps un vif regain d'intérêt, en particulier parce qu'il est maintenant clairement établi que le système immunitaire inné active et oriente la réponse des lymphocytes. Deux publications récentes permettent de mieux comprendre comment l'ADN bactérien, caractérisé par la présence de motifs CpG non méthylés, est reconnu par le système immunitaire inné, et active une réponse  $T_H1$ .

### L'activation des PRR déclenche la réponse innée

La raison de la rapidité de la réponse innée est que les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales qui se trouvent en première ligne dans la lutte contre les agents infectieux, utilisent des récepteurs préformés, ou *pattern recognition receptors* (PRR) selon la nomenclature proposée par Charlie Janeway dès 1989. Ces récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires conservés des microorganismes, ou PAMP (*pathogen associated molecular pattern*), qui sont caractérisés par les trois propriétés suivantes : (1) ils sont caractéristiques des micro-organismes mais sont absents des cellules de l'hôte ; (2) ils sont communs à de nombreuses

espèces de microorganismes pathogènes, ce qui permet de compenser le nombre limité de PRR par rapport à l'énorme diversité des microorganismes potentiellement infectieux ; et (3) les molécules formant ces motifs sont essentielles pour la survie des micro-organismes, ce qui limite l'apparition de mutants échappant à la reconnaissance [1]. Les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif ou les peptidoglycanes (PGN) des bactéries à Gram positif sont des prototypes de PAMP puisque ces molécules sont essentielles à la structure de la paroi des bactéries et sont des activateurs bien connus de la réponse inflammatoire. Les PRR impliqués dans la reconnaissance des LPS et des PGN sont longtemps restés inconnus, avant que les travaux du groupe de Jules Hoffmann à Strasbourg ne mettent en évidence chez la mouche drosophile l'importance d'un nouveau type de récepteur, baptisé Toll, dans la réponse immunitaire innée ([2] et *m/s* 2000, n° 12, p. 1437). Ces travaux ont conduit à l'identification de 10 récepteurs apparentés à Toll chez les mammifères et appelés TLR (*toll-like receptor*)-1 à -10. Ces récepteurs recrutent une molécule adaptatrice commune, MyD88, qui active une cascade de signalisation aboutissant à la kinase IKK $\beta$ . Cette dernière phosphoryle l'inhibiteur cytoplasmique I $\kappa$ B, qui se dissocie alors du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et le laisse libre de pénétrer dans le noyau et d'activer la transcription de plusieurs gènes cibles (*m/s* 2000, n° 12, p. 143). Au cours des deux dernières années, plusieurs études menées notamment par les groupes de Bruce Beutler à l'Université de Dallas et de Shizuo

Akira à l'Université d'Osaka, et utilisant des souris naturellement résistantes au LPS ou des souris knock-out, ont permis d'établir que TLR4 était impliqué dans la reconnaissance des LPS, alors que TLR2 était impliqué dans la reconnaissance des PGN, mais aussi des lipoprotéines bactériennes [3, 4] (*figure 1*). Ces résultats indiquent que les TLR jouent un rôle critique dans le contrôle de la réponse innée, et suggèrent qu'ils pourraient constituer une famille de PRR impliqués dans la reconnaissance de différentes structures conservées des microorganismes. Ce concept vient de recevoir une nouvelle confirmation avec la caractérisation d'un nouveau membre de la famille, TLR9.

### L'ADN bactérien : un PAMP original

On sait depuis plusieurs années que l'ADN bactérien possède une puissante activité immunostimulatrice. L'analyse de ce phénomène a permis de montrer que des petits motifs d'ADN contenant le dinucléotide CpG non méthylé (ou « motif CpG ») était responsable de cette activation (revue dans [5]). Deux différences importantes existent entre l'ADN des mammifères et l'ADN bactérien en ce qui concerne ces motifs CpG : premièrement, la fréquence des dinucléotides CpG est fortement réduite chez les mammifères par rapport à la fréquence théorique attendue, ce qui n'est pas le cas chez les bactéries ; et deuxièmement 70 % des résidus cytosine présents dans un motif CpG dans l'ADN des mammifères sont méthylés, ce qui n'est généralement pas le cas dans l'ADN génomique bactérien. Au final, les dinucléotides

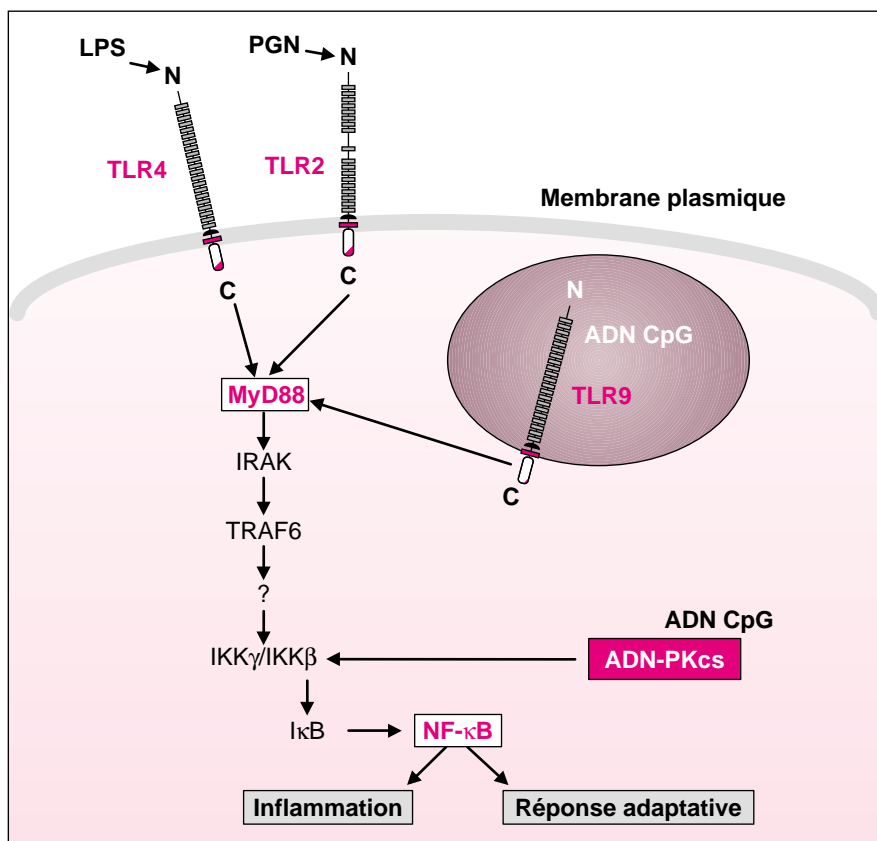


Figure 1. **Reconnaissance des pathogènes associated molecular patterns (PAMP) par le système immunitaire inné.** Trois TLR sont impliqués dans la reconnaissance de PAMP : à la surface des cellules, TLR2 et TLR4 sont nécessaires pour l'activation par des PAMP exprimés à la surface des micro-organismes, comme les peptidoglycanes (PGN) des bactéries à Gram positif, et les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à Gram négatif. TLR9, qui est probablement localisé dans un compartiment intracellulaire, est nécessaire pour l'activation par l'ADN bactérien, qui contient des motifs CpG non méthylés. Les domaines intracellulaires conservés des TLRs recrutent l'adaptateur MyD88 et activent une voie de signalisation qui mène à l'activation de la kinase IKK $\beta$ . Celle-ci phosphoryle l'inhibiteur I $\kappa$ B et induit sa dégradation, libérant ainsi NF- $\kappa$ B qui va activer les gènes de la réponse inflammatoire (par exemple TNF $\alpha$ , iNOS, sélectine E) et de la réponse adaptative (par exemple IL-12, MHC II, CD80, CD86). La sous-unité catalytique de la kinase ADN-PK (ADN-PKcs) est également nécessaire pour l'activation de NF- $\kappa$ B par les motifs CpG. La fixation de l'ADN dérivé de bactérie à ADN-PKcs active la kinase, qui va phosphoryler et activer IKK $\beta$ . Les répétitions riches en leucine et les motifs riches en cystéine sont représentés respectivement par des rectangles et des demi-cercles.

CpG non méthylés sont 20 fois plus fréquents dans l'ADN bactérien que dans l'ADN de mammifère. La démonstration que la méthylation de la position C-5 de la cytosine réduit l'activité immunostimulatrice du motif CpG confirme qu'il constitue un type de PAMP original, puisque

non exposé en surface du micro-organisme [5]. Comment ce PAMP est-il reconnu par le système immunitaire ? Une première indication est apparue au cours de l'année passée avec la démonstration par deux groupes indépendants de l'absence de réponse au motif CpG dans des

cellules dans lesquelles le gène MyD88 a été inactivé [6, 7]. Ce résultat suggérait qu'un TLR pouvait être impliqué dans la réponse au motif d'ADN CpG. Cependant, ces études montraient également que les macrophages de souris invalidées pour TLR2 ou TLR4 répondaient normalement au motif CpG. Par ailleurs, la transfection de cellules en culture avec des vecteurs exprimant TLR1 à 6 ne confère pas aux cellules la capacité d'être activées par le motif CpG. Le groupe de S. Akira vient de lever ce paradoxe en montrant que des souris dans lesquelles le gène codant pour un autre TLR, TLR9, a été inactivé ne répondent plus au motif CpG, et ceci quel que soit le type cellulaire examiné (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques) et le type de test effectué (augmentation de la prolifération cellulaire, augmentation de la sécrétion de cytokines ou de l'expression de marqueurs membranaires spécifiques) [8]. De plus, TLR9 semble reconnaître spécifiquement le motif CpG puisque la réponse des souris mutantes au LPS ou au PGN est normale. Il est cependant probable que l'activation de TLR9 par l'ADN bactérien ne soit pas suffisante pour obtenir une activation maximale de la réponse immunitaire, comme le montrent d'autres résultats publiés récemment.

#### Deux récepteurs indépendants actif NF- $\kappa$ B en réponse à l'ADN bactérien

La protéine kinase dépendante de l'ADN (ADN-PK) est une sérine-thréonine kinase de la famille des PI3 kinases qui est activée par l'association avec des extrémités libres d'ADN. Cette enzyme, constituée d'une sous-unité catalytique, ADN-PKcs, et d'une sous-unité régulatrice, Ku, est impliquée dans la réparation des coupures double brin de l'ADN (pour revue, voir [9]). Eyal Raz *et al.* à l'Université de Californie à San Diego viennent de montrer que la production d'IL-6 et d'IL-12 n'était pas induite par le motif CpG dans des macrophages dérivés de souris dans lesquelles le gène codant pour ADN-PKcs a été inactivé alors que ces macrophages répondent

normalement au LPS [10]. Des oligonucléotides comportant un motif CpG non méthylé sont capables d'activer l'activité kinase d'ADN-PKcs *in vitro*, indiquant que ce PAMP active directement cette enzyme. De plus, dans ces conditions contrôlées, l'ADN bactérien est un meilleur activateur que de l'ADN extrait de cellules de mammifères. L'absence d'activation de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-12 est accompagnée par une absence d'activation de IKK $\beta$ , ce qui suggère qu'ADN-PKcs agit en amont de cette kinase. D'autres expériences ont permis de montrer qu'ADN-PKcs active directement IKK $\beta$  en le phosphorylant, démontrant ainsi l'existence d'un second mécanisme d'activation de NF- $\kappa$ B par les motifs CpG [10] (*figure 1*).

### Conclusions et perspectives

Deux mécanismes d'activation de l'immunité innée par l'ADN bactérien viennent donc d'être identifiés coup sur coup. Ce nouveau PAMP n'est plus localisé à la surface du micro-organisme, mais est constitué du cœur même de la bactérie, son génome. Il est fascinant de voir que le système immunitaire inné retourne ici contre les bactéries l'un de leurs propres mécanismes de défense. En effet, les bactéries méthylent certaines séquences au niveau de leur génome (pas les CpG!) et utilisent des enzymes de restriction capables

de couper ces mêmes séquences, non méthylées, provenant d'un de leur pathogène comme le bactériophage. De nombreuses questions demeurent cependant, en particulier en ce qui concerne la spécificité de l'activation par l'ADN bactérien: on sait en effet que l'ADN du génome des vertébrés contient des motifs CpG non méthylés, qui ne semblent pas stimuler de réponse immunitaire comme l'ADN bactérien. De plus, il est clair que l'ADN-PKcs n'est pas suffisante pour assurer une discrimination complète entre l'ADN bactérien et mammifère, puisque cette enzyme peut être activée par l'ADN de son propre génome, notamment au niveau des sites de cassure. D'autres expériences seront en outre nécessaires pour déterminer si TLR9 et ADN-PKcs fonctionnent indépendamment l'un de l'autre, ou s'ils font partie d'une même voie de signalisation. L'identification de deux molécules permettant de détecter l'ADN bactérien, et l'existence de souris mutantes dans lesquelles les gènes codant pour ces PRR ont été inactivés, devraient néanmoins rapidement permettre de clarifier l'importance du rôle de la reconnaissance de l'ADN CpG dans la réponse antibactérienne. Ces modèles devraient également permettre de mieux comprendre et maîtriser l'efficacité des vaccins à ADN, dans lesquels l'ADN plasmidique bactérien sert à la fois de matrice permettant la production d'antigène et d'adjuvant.

1. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-8.
2. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffmann J. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-83.
3. 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: 2085-8.
4. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al*. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443-51.
5. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 35-43.
6. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000; 192: 595-600.
7. Schnare M, Holtzclaw AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol* 2000; 10: 1139-42.
8. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al*. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.
9. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev* 1999; 13: 916-34.
10. Chu W, Gong X, Li Z, *et al*. DNA-PKcs is required for activation of innate immunity by immunostimulatory DNA. *Cell* 2000; 103: 909-18.

**Jean-Luc Imler**  
**Jean-Marc Reichhart**

*Université Louis-Pasteur, IBMC, UPR  
9022 du Cnrs, 15, rue René-Descartes,  
67084 Strasbourg Cedex, France.*

EUR $\Omega$ CONFÉRENCES