le TLR5: un partenaire crucial pour la phagocytose et l'élimination de Pseudomonas aeruginosa par les macrophages alvéolaires impliquant l'IL-1b et l'aspragine endopeptidase

Delphyne Descamps, Benedicte Manoury, Jean-Michel Sallenave

▶ **To cite this version:**

Delphyne Descamps, Benedicte Manoury, Jean-Michel Sallenave. le TLR5: un partenaire crucial pour la phagocytose et l'élimination de Pseudomonas aeruginosa par les macrophages alvéolaires impliquant l'IL-1b et l'aspragine endopeptidase. SFI Actualités, 2012, 126, pp.10-12. hal-01606733

HAL Id: hal-01606733
https://hal.science/hal-01606733

Submitted on 28 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

REFERENCES

1. Elefteriou F et al 2008. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. Arch Biochem Biophys 473:2231-2236.
2. Yadav VK et al 2008. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. Cell 135:825-837.
3. Cui Y et al 2011. Lrp5 functions in bone to regulate bone mass. Nat Med 17:684-691.
4. Bliziotes MM et al 2001. Neurotransmitter action in osteoblasts: expression of a functional system for serotonin receptor activation and reuptake. Bone 29:477-486.
5. Gustafsson BI et al 2006. Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function *in vitro*. J Cell Biochem 98:139-151.
6. Westbroek I et al 2001. Expression of serotonin receptors in bone. J Biol Chem 276:28961-28968.
7. Warden SJ et al 2005. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. Endocrinology 146:685-693.
8. Collet C et al 2008. The serotonin 5-HT2B receptor controls bone mass via osteoblast recruitment and proliferation. FASEB J 22:418-427.
9. Chabbi-Achengli Y et al 2012. Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. Proc Natl Acad Sci USA 109:2567-2572.

LE TLR5 : UN PARTENAIRE CRUCIAL POUR LA PHAGOCYTOSE ET L'ELIMINATION DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAR LES MACROPHAGES ALVEOLAIRES IMPLIQUANT L'IL1-β ET L'ASPARAGINE ENDOPEPTIDASE

Delphyne Descamps[1]
Bénédicte Manoury[1]
Jean-Michel Sallenave[2,3,4]

[1]Inserm U1013, Hôpital Necker–Enfants Malades, Paris
[2]Défense Innée et Inflammation, Institut Pasteur,
[3]Inserm U874, Paris, 4 Univ. Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur.

delphyne.descamps@inserm.fr,
bénédicte.manoury@inserm.fr
jms@pasteur.fr

2

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est un bacille Gram-négatif mono-flagellé. Cette bactérie opportuniste est particulièrement importante dans les pneumonies nosocomiales et les maladies pulmonaires chroniques, telle que la mucoviscidose où l'infection par *P. aeruginosa* est la plus fréquente cause de morbidité et de mortalité. De nombreuses souches cliniques ont été isolées, démontrant la capacité de ce pathogène ubiquitaire à s'adapter rapidement à son environnement et à développer ou à acquérir des résistances à de multiples agents anti-microbiens (1). Devant la virulence potentielle de cette bactérie, une meilleure compréhension de la pathogénicité de *P. aeruginosa* et des mécanismes moléculaires impliqués dans les interactions précoces hôte/pathogène est requise pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Décrite par Eli Metchnikov, la phagocytose est un processus de défense innée déclenché par les cellules immunitaires appelées phagocytes (monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques), dont le but est d'internaliser et de tuer le pathogène détecté. Les phagocytes expriment à leurs surfaces une multitude de récepteurs tels que les récepteurs Fc, les récepteurs au complément ou au mannose, les récepteurs Scavenger, et des récepteurs Toll (TLRs) qui sont nécessaires à la reconnaissance, l'adhésion et l'internalisation du pathogène. Ce contact pathogène/phagocyte active des réseaux complexes de signalisation cellulaire entrainant le réarrangement du cytosquelette, l'activation du phagosome et des mécanismes lytiques anti-microbiens, la libération de chimiokines et de cytokines, et la production de molécules nécessaires à une présentation antigénique efficace pour activer la réponse immunitaire adaptative (2).

Un défaut de reconnaissance et de clairance précoce de la bactérie par les macrophages alvéolaires (MAs), les premières sentinelles tissulaires des poumons, sont suspectés dans la mucoviscidose. Les MAs expriment différents TLRs capables de reconnaitre spécifiquement des motifs conservés à la surface des pathogènes. De nombreuses études ont associé l'activation des TLRs par leur ligand à la production

de cytokines et de chimiokines par les phagocytes, mais peu de travaux ont décrit l'importance de l'engagement des TLRs dans la phagocytose, la maturation du phagosome et la clairance des bactéries par les MAs (3, 4). Le TLR5 est connu pour être l'un des récepteurs important des MAs impliqué dans la reconnaissance de la flagelline, le monomère constituant le flagelle de *P. aeruginosa* (1,5). Par ailleurs, il a été rapporté que différents types de leucocytes étaient incapables de phagocyter des bactéries non-flagellées (6). Toutefois, aucune étude n'avait décrit le rôle du TLR5 dans l'internalisation et la destruction de *P. aeruginosa* par les MAs. Dans le cadre d'un projet financé par l'association Vaincre la Mucoviscidose, nous avons entrepris de comprendre l'implication de l'interaction TLR5/flagelline-flagelle dans l'élimination précoce de *P. aeruginosa* par les MAs (7).

La clairance de *P. aeruginosa* par les MAs nécessite l'interaction du TLR5 avec la bactérie

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'impact de l'activation du TLR5 sur la capacité des MAs à tuer *P. aeruginosa* en évaluant la clairance des bactéries par les MAs incubés soit avec la souche sauvage flagellée PAK de *P. aeruginosa* capable d'induire un signal TLR5, soit avec différents mutants de PAK dépourvus de flagelle (PAKΔfliC) ou exprimant une flagelline modifiée au niveau du site d'interaction avec le TLR5 (PAKL88 et PAKL94) et incapables d'activer efficacement ce récepteur (8,9). Nous avons mis en évidence que des bactéries non-flagellées ou exprimant une flagelline présentant un défaut d'activation du TLR5, ne sont pas éliminées par les MAs. De la même façon, nous avons montré *ex vivo* et *in vivo* que des MAs issus de souris déficientes pour l'expression du TLR5 sont incapables de tuer les bactéries *P. aeruginosa* et que cette interaction dépend d'une liaison spécifique et fonctionnelle entre le flagelle de la bactérie et le TLR5 des MAs.

La signalisation TLR5/MyD88 est nécessaire à la phagocytose de *P. aeruginosa* par les MAs

Dans un second temps, nous avons montré que l'interaction TLR5/flagelle n'induisait pas d'activité bactéricide extracellulaire mais favorisait l'internalisation de *P. aeruginosa* dans les MAs. Cette observation a également été validée par l'utilisation des MAs de souris déficientes pour l'expression du TLR5 ou de MyD88 (adaptateur moléculaire du signal TLR5) qui présentent également un déficit de 50% d'entrée de *P. aeruginosa* dans les cellules. Au contraire, nous avons mis en évidence que l'absence d'expression du TLR4 n'avait pas d'influence sur la capture de *P. aeruginosa* par les MAs. Ces résultats décrivent pour la première fois l'importance de l'activation du signal TLR5/MyD88 dans la phagocytose de *P. aeruginosa* par les MAs (Figure 1A).

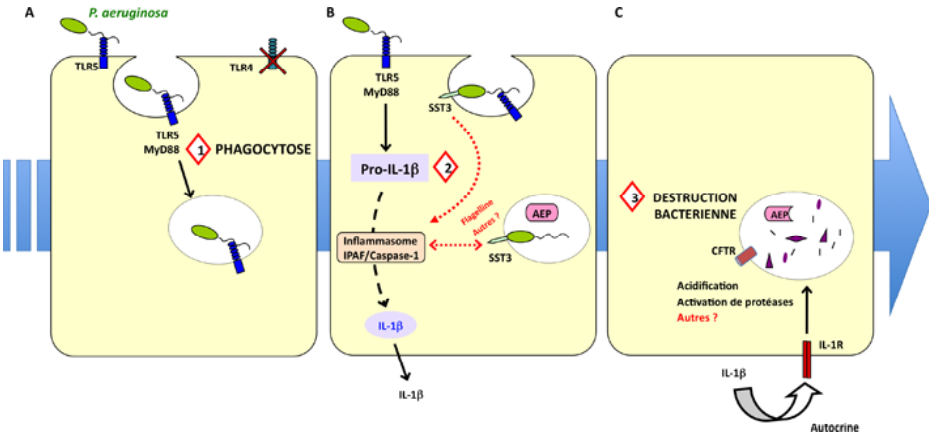

Figure 1A
La phagocytose et la destruction de P. aeruginosa par les MAs.

Le signal TLR5 participe à la production de l'interleurline-1β (IL-1β) par les MAs

De façon surprenante, bien que la souche modifiée PAKL94, dont la flagelline interagit moins efficacement avec TLR5 que la flagelline sauvage, soit phagocytée à plus de 70%, nous avons observé que ce mutant de *P. aeruginosa* n'est pas tué par les MAs. Nous avons déterminé que cette déficience est liée à une quasi-absence de synthèse d'IL-1β mature, par rapport à une infection par la bactérie sauvage. De la même manière, nous avons découvert un déficit de sécrétion de l'IL-1β par les MAs issus de souris n'exprimant pas le TLR5. Les analyses moléculaires ont établi que le défaut de libération de l'IL-1β observé dans ces MAs n'était pas lié à un problème d'activation de la caspase-1, protéase responsable de la conversion de la pro-IL-1β en IL-1β, mais à un défaut de synthèse de la pro-forme. La production de l'IL-1β est donc dépendante de l'activation du TLR5 des MAs lors d'une infection par *P. aeruginosa* (Figure 1B).

L'IL-1β est nécessaire à l'élimination de *P. aeruginosa* par les MAs

Les résultats précédents semblent associer l'absence de clairance bactérienne à un défaut de sécrétion de l'IL-1β. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé une souche modifiée de PAK dépourvue du système de sécrétion de type III (SST3), PAKΔpscF, et avons montré que les MAs infectés par ce mutant ne sécrètent pas l'IL-1β. De plus, bien qu'efficacement phagocytée par les cellules, ce mutant de *P. aeruginosa* n'est pas tué par les MAs, validant un lien entre la clairance bactérienne et une réduction majeure de la sécrétion d'IL-1β. De façon intéressante, l'ajout d'IL-1β dans le surnageant de culture des MAs (à des doses qui n'induisent pas de toxicité pour les cellules) pendant l'infection par PAKL94, provoque la mort de cette souche modifiée. L'importance de la présence de l'IL-1β dans le surnageant cellulaire pour permettre la clairance bactérienne a été validée par des expériences utilisant, soit un inhibiteur naturel de l'IL-1β, l'IL-1RA, soit des MAs issus de souris déficientes pour l'expression du récepteur à l'IL-1β (IL-1R) (Figure 1C).

La clairance bactérienne induite par l'IL-1β est dépendante d'une protéase, l'asparagine endopeptidase (AEP)

Nous avons ensuite choisi d'explorer les mécanismes moléculaires nécessaires à l'élimination de *P. aeruginosa* par les MAs et déclenchés par cette sécrétion de l'IL-1β. Grâce à l'utilisation de la bafilomycine A, un inhibiteur de la pompe à protons (la v-ATPase), nous avons confirmé que l'acidification des phagolysosomes des MAs est nécessaire pour la lyse bactérienne

et que l'IL-1β était impliqué directement dans ce phénomène. Comme un certain nombre de cysteine-protéases présentes dans les lysosomes possèdent une activité pH-dépendante, nous avons démontré spécifiquement l'importance de la protéase AEP dans la clairance de *P. aeruginosa* par les MAs. Nous avons mis en évidence que la bactérie sauvage PAK entraîne une consommation de l'AEP au cours de l'infection, ce qui n'est pas le cas avec dans les MAs infectés par les souches bactériennes modifiées présentant un déficit de sécrétion de l'IL-1β comme PAKL94 ou PAKΔpscF. Cependant, l'ajout d'IL-1β dans le surnageant de culture des MAs infectés par PAKL94 restaure la consommation de l'AEP. Enfin, nous avons confirmé l'importance de l'activité de cette protéase dans la clairance de *P. aeruginosa* en utilisant des MAs provenant de souris déficientes pour l'expression de l'AEP. Ainsi, bien que ces MAs phagocytent normalement PAK, ces cellules dépourvues d'AEP sont incapables d'éliminer *P. aeruginosa* aussi efficacement que des MAs sauvages (Figure 1C).

Conclusion et perspective

Nos résultats apportent des données mécanistiques sur les évènements précoces (moins de 4 heures) suivant l'infection par *P. aeruginosa* des MAs et étendent notre compréhension du rôle déterminant du TLR5 dans les défenses du poumon contre ce pathogène. Ainsi, l'ensemble de nos travaux montre que dans le cadre d'une infection précoce par *P. aeruginosa*, l'interaction TLR5/flagelle apparaît comme une reconnaissance hôte/pathogène cruciale pour déclencher la phagocytose et la destruction efficace de cette bactérie par les MAs. L'engagement du TLR5 par *P. aeruginosa*, à travers l'activation de MyD88, entrainent la production de l'IL-1β qui est nécessaire à l'activation des mécanismes responsables de l'élimination bactérienne.

Comme indiqué précédemment, notre étude pourrait ouvrir des portes thérapeutiques dans les infections nosocomiales et dans le cadre de la mucoviscidose. En particulier, les MAs de jeunes patients mucoviscidosiques sont incapables d'éliminer correctement *P. aeruginosa* lorsqu'ils sont infectés. Cette présence persistante des bactéries provoque une colonisation bactérienne chronique et une inflammation exacerbée des voies pulmonaires qui conduisent progressivement à la destruction des poumons. Nous sommes en cours de validation de notre hypothèse d'un déficit TLR5/IL-1β dans les MAs de patients mucoviscidosiques et nous avons notamment montré que les MAs de souris exprimant la mutation ΔF508 dans le gène CFTR présentent un défaut de clairance de *P. aeruginosa* et une perte significative de sécrétion de l'IL-1β (manuscrit en préparation). Ce travail ouvre donc la voie pour de nouvelles pistes d'études liant l'activation du TLR5 et la production de l'IL-1β pour la résolution des infections à *P. aeruginosa*, en particulier, mais l'activation de cette nouvelle voie de signalisation et d'éradication de pathogènes pourrait s'appliquer également à d'autres bactéries flagellées !

Remerciements

Ces travaux de recherche sont soutenus par l'association Vaincre La Mucoviscidose.

REFERENCES

1. Descamps D et al 2012. Pseudomonas aeruginosa : a Model Pathogen with Multiple Virulence Factors for the Study of Innate Immune Defense in Lung. Dans Bacterial Pathogens: Virulence Mechanisms, Diagnosis and Management. NOVA Biomedical Publishers. Sous presse.
2. Underhill D et al 2002. Phagocytosis of microbes : Complexity in Action. Annu Rev Immunol 20:825-52.
3. Murray P et al 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol 11:723-37.
4. Blander JM et al 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. Science 304:1014-1018.
5. Kawai T et al 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. Nat Immunol 11:373-384.
6. Mahenthiralingam E et al 1995. Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. Infect Immun 63:4519-4523.
7. Descamps D et al 2012. TLR5, IL-1β secretion and asparagine endopeptidase are critical factors for alveolar macrophages phagocytosis & bacterial killing. Proc Natl Acad Sci USA. 109:1619-1624.
8. Verma A et al. 2005. Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. Infect Immun 73:8237-8246.
9. Balloy V et al 2007. The role of flagellin versus motility in acute lung disease caused by *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis 196:289-296.