

Récepteurs et médiateurs de l'immunité innée

Dr. Isabelle CREMER
MCU Université Paris 6
U872 INSERM, équipe 13: Tumeurs et microenvironnement immunitaire
Centre de Recherche des Cordeliers. Paris 6ème
Tél: 01 53 10 04 10

Février 2008

Qu'est-ce-que l'immunité innée?

Définition: L'immunité innée est un mécanisme de défense non spécifique contre les pathogènes et qui est utilisé par l'hôte immédiatement ou dans les quelques heures qui suivent l'exposition à un antigène.

La plupart des cellules du système immunitaire expriment des récepteurs appelés « **Pattern-Recognition Receptors** »:PRR.

Ces récepteurs reconnaissent des molécules aux motifs **structuraux très conservés** présents sur l'enveloppe des micro-organismes mais absents des cellules eucaryotes.

Ces structures reconnues sont appelées « **Pathogen-Associated Molecular Patterns** »:PAMPs.

Comparaison entre immunité innée et adaptative

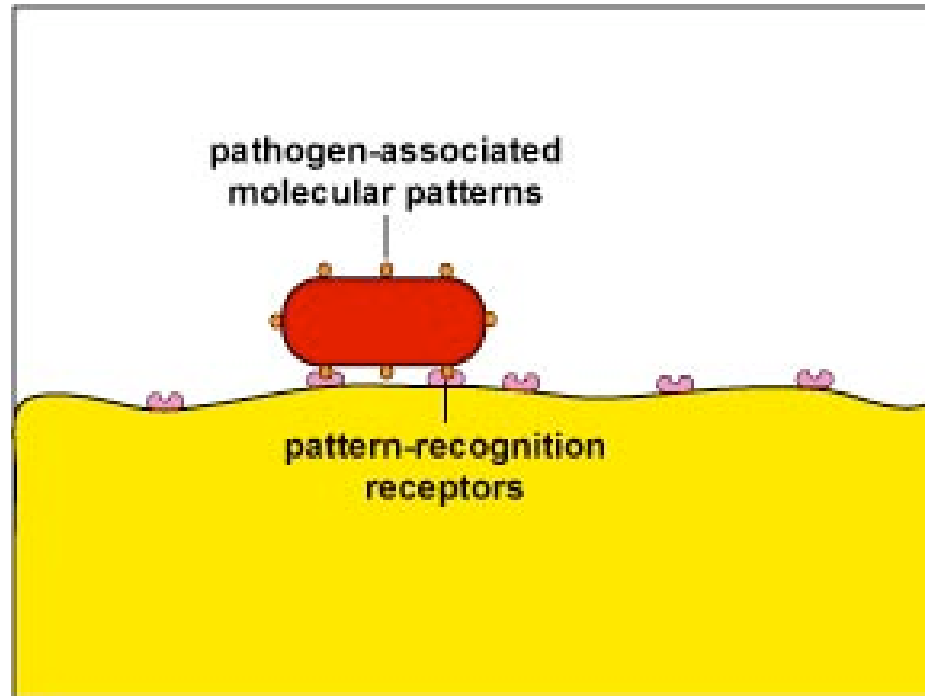
	Inate immune system		Adaptive immune system
Evolutionary history	Ancient (plants, insects, mammals) Billions of years old		Modern (jawed vertebrates) 400 million years old
Recognition	PAMPs (commonly carbohydrate and lipids)		Specific detail of molecular structure
Receptors	Fixed in genome (invariant) Rearrangement not necessary Non-clonal Diverse cellular distribution	Co-stimulation Education Cooperation ↔	Encoded in gene segments (variability) Rearrangement necessary Clonal Lymphocytes
Self–nonself discrimination	Perfect		Imperfect; hence, autoimmune disease, allergy and allograft rejection
Time to onset	Immediate		Delayed
Memory	No		Yes

TRENDS in Parasitology

Fig. 1. Essential features of the innate and adaptive immune responses. Although differences between innate and adaptive immunity can be conveniently boxed, their mutual co-evolution means that they are functionally dependent on each other for optimal antiparasite responses. This figure is adapted from Ref. [1]. Abbreviation: PAMPs, pathogen-associated molecular patterns.

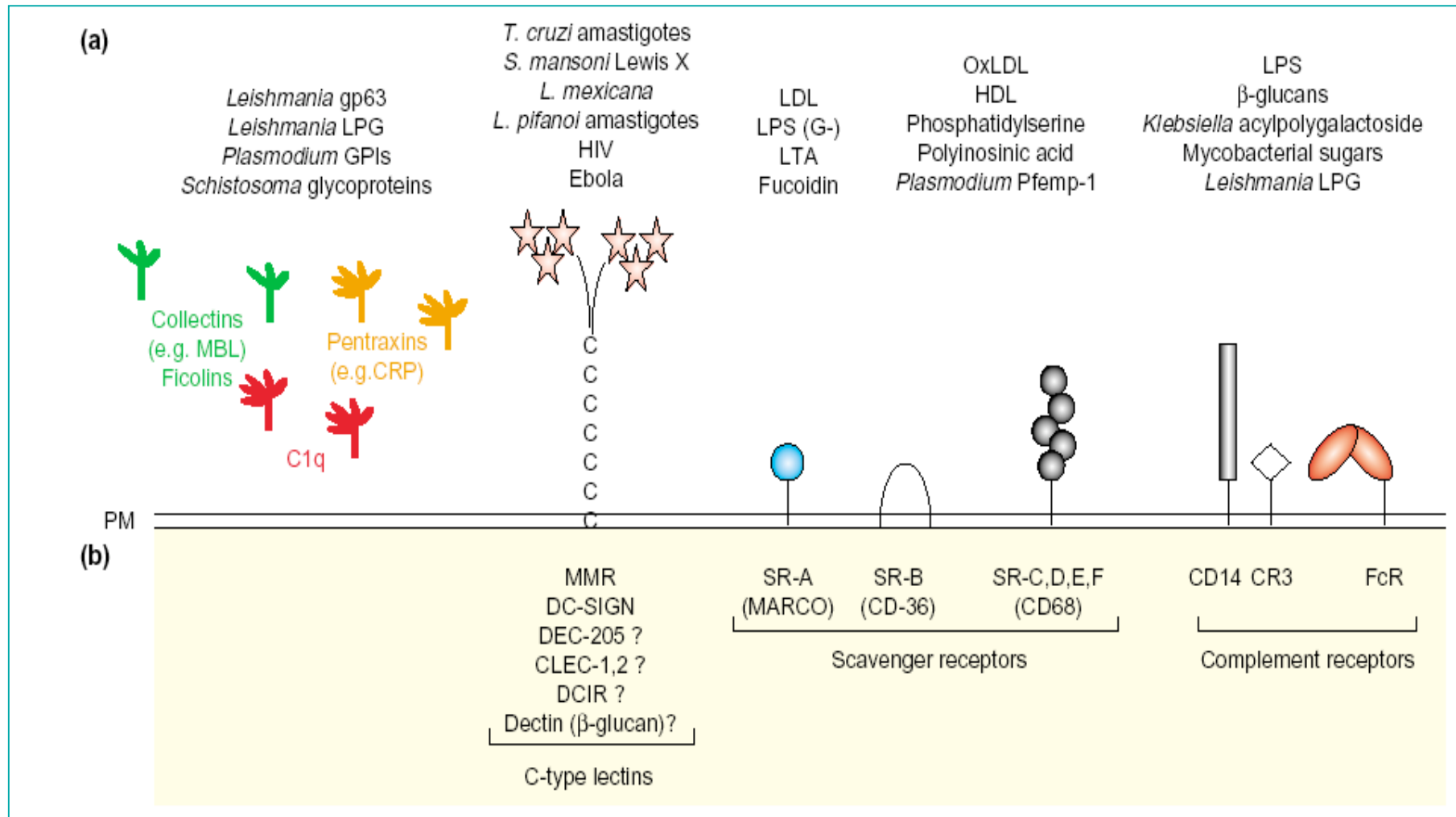
(McGuinness D.H. *et al.* 2003. Trends in Parasitology 19:312)

Reconnaissance des PAMPs par les PRR



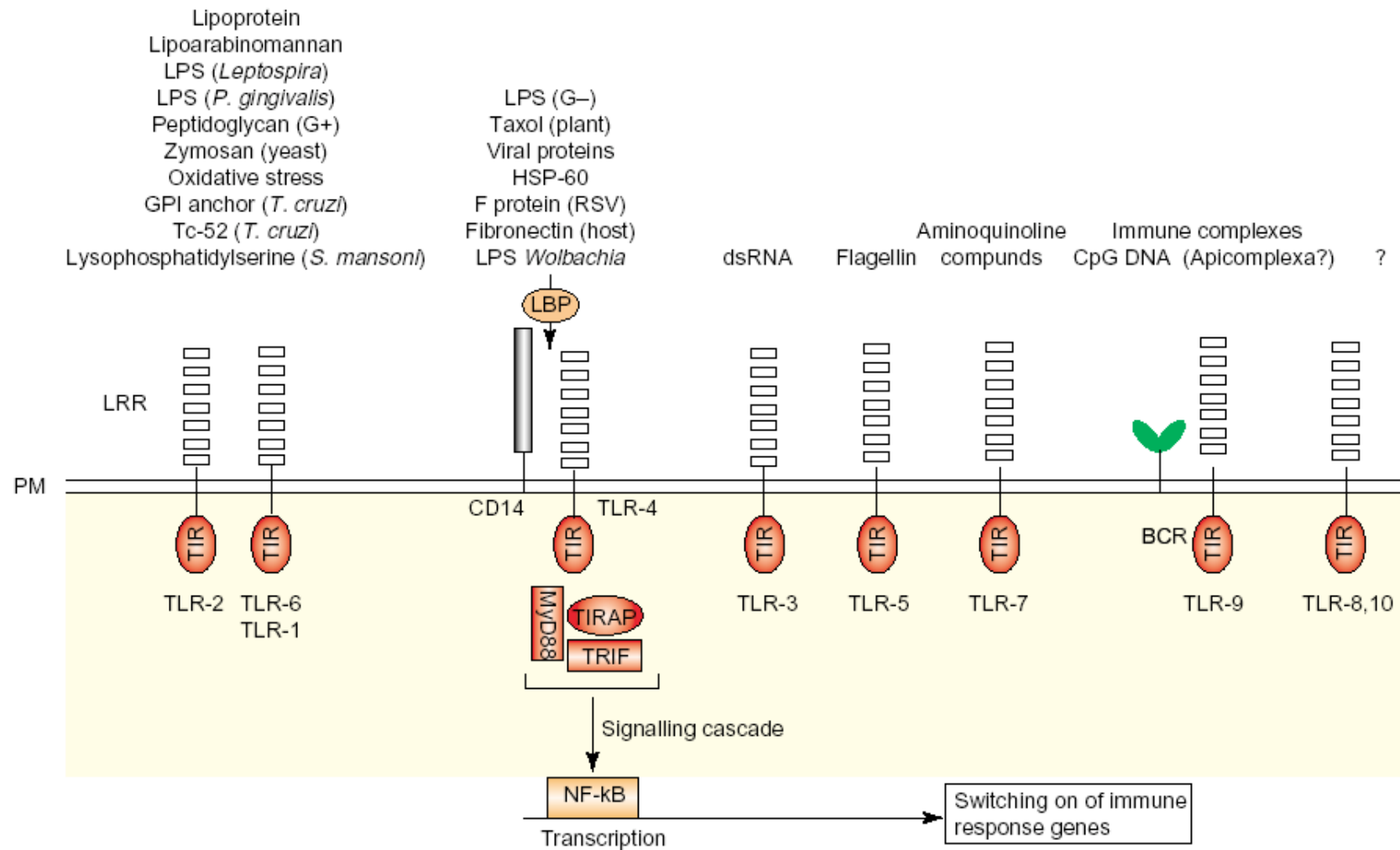
- 1) Reconnaissance TLR-PAMPs
- 2) Activation des cellules
- 3) Sécrétion des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires: $\text{TNF-}\alpha$, Il-1, Il-6, IL-8.

Les récepteurs de l'immunité innée (1)

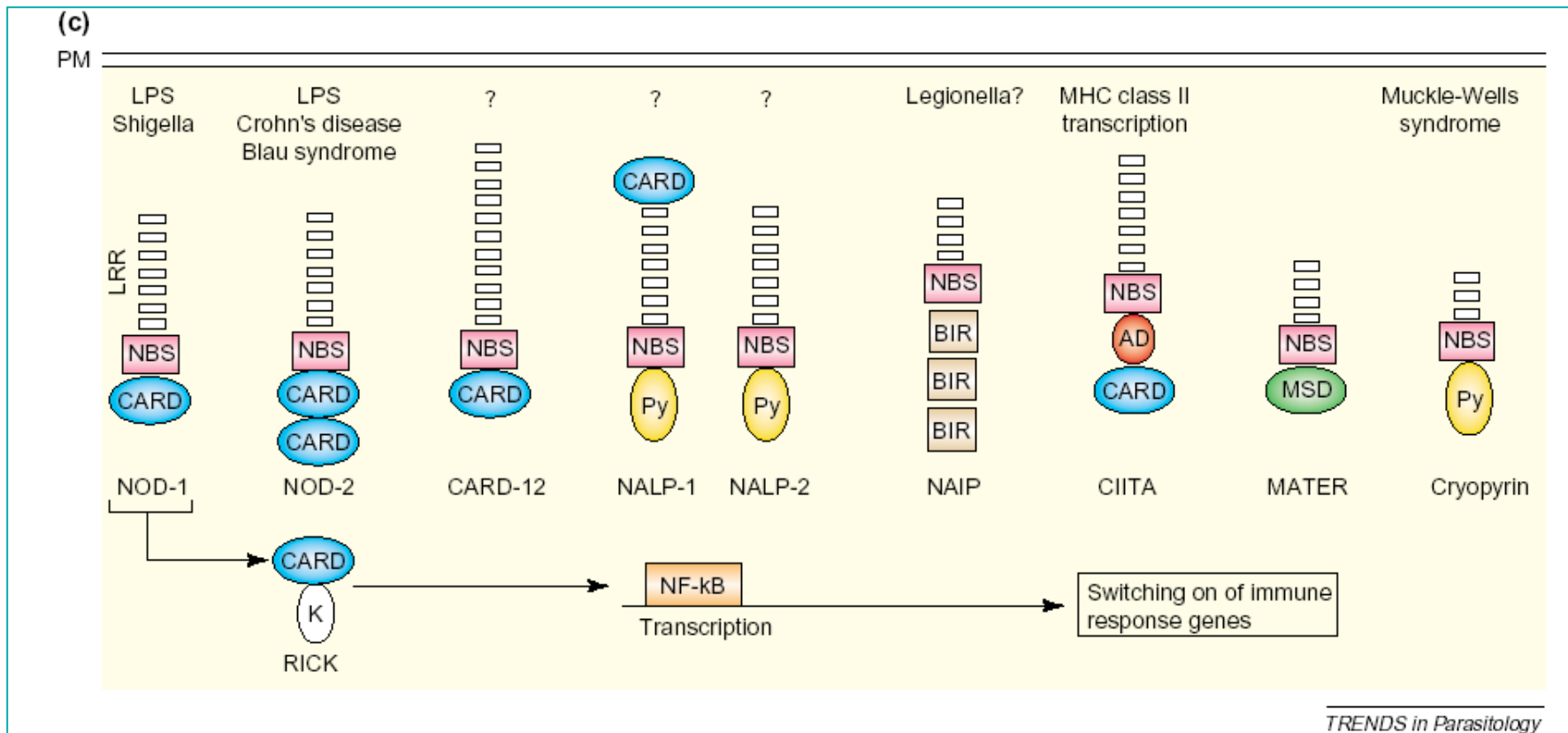


(McGuinness D.H. *et al.* 2003. Trends in Parasitology 19:312)

Les récepteurs de l'immunité innée (2)



Les récepteurs de l'immunité innée (3)



Les récepteurs « Toll-like »

Toll est un gène de drosophile essentiel pour l'**ontogénèse** et la **résistance antimicrobienne**.

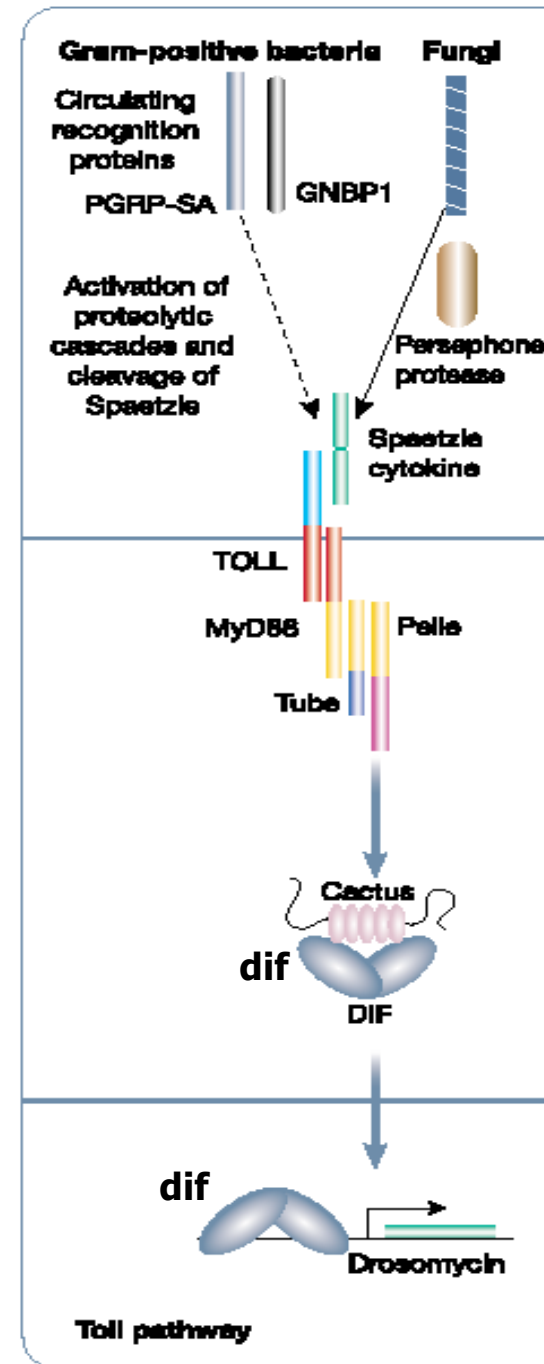
Plusieurs homologues de *Toll* ont été identifiés et clonés dans les vertébrés et ont été nommés les « Toll-like receptors » (**TLR**).

La famille des récepteurs « Toll-like » comprend des protéines transmembranaires phylogénétiquement conservées qui sont essentielles pour l'immunité innée.

Le récepteur Toll chez la drosophile

Après fixation des ligands sur le récepteur Toll, la voie de transduction faisant intervenir l'adaptateur moléculaire MyD88 est activée, induisant la translocation de dif (*Drosophila* Immunity Factor) (famille des protéines NF- κ B) dans le noyau et l'activation de la transcription de peptides antimicrobiens comme la drosomycine et la défensine.

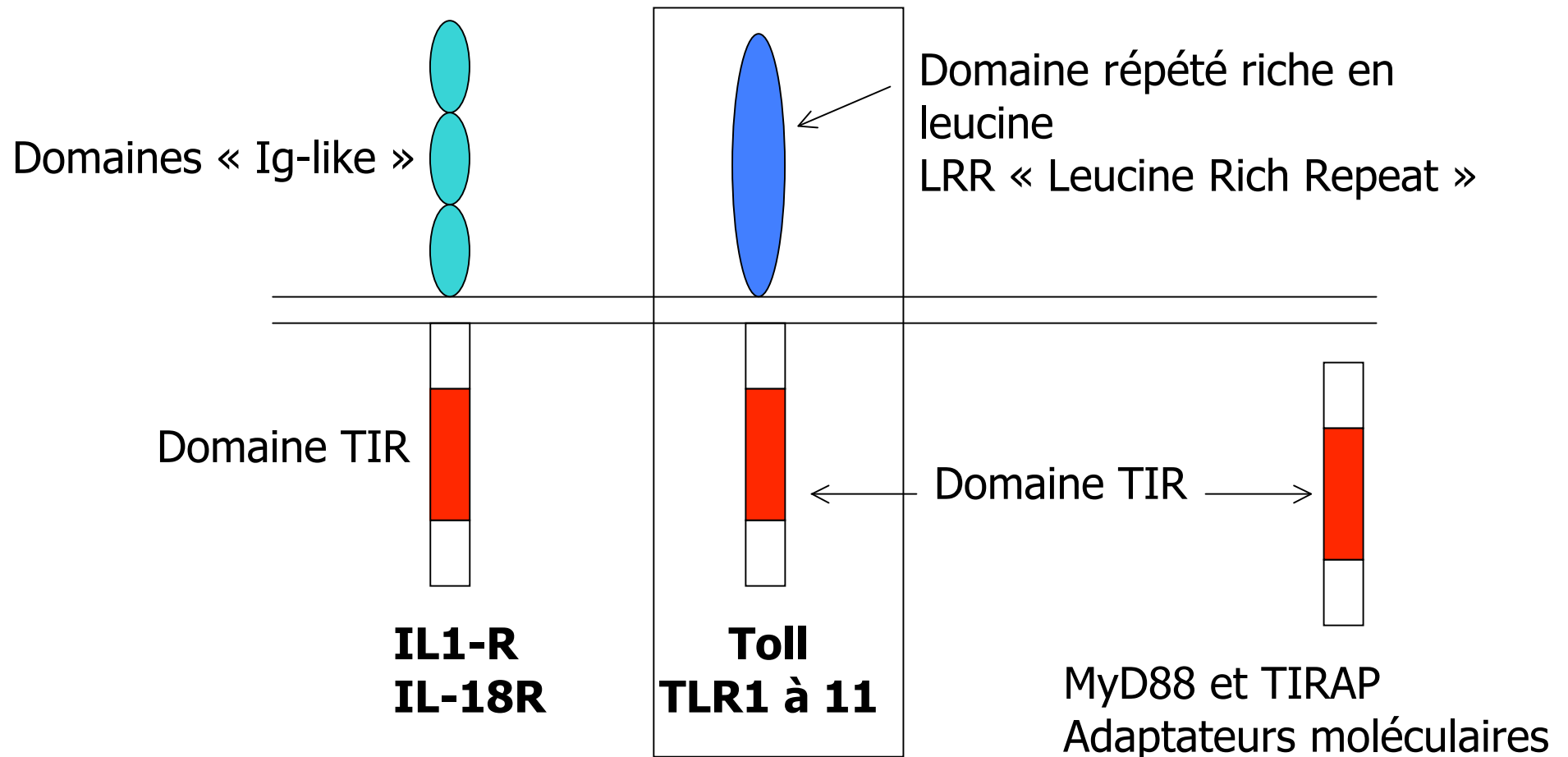
(Hoffmann J.A. *et al.* 2003. Nature 426:33)



Généralités sur les TLR

- 1) Famille de 11 récepteurs transmembranaires, en surface ou intracellulaires
- 2) Fonctions dans la reconnaissance des PAMPs, de façon spécifique
- 3) Reconnaissance d'un ou plusieurs ligands différents
- 4) Certains ligands ne sont toujours pas identifiés
- 5) Certains TLR requièrent des protéines accessoires pour leurs fonctions

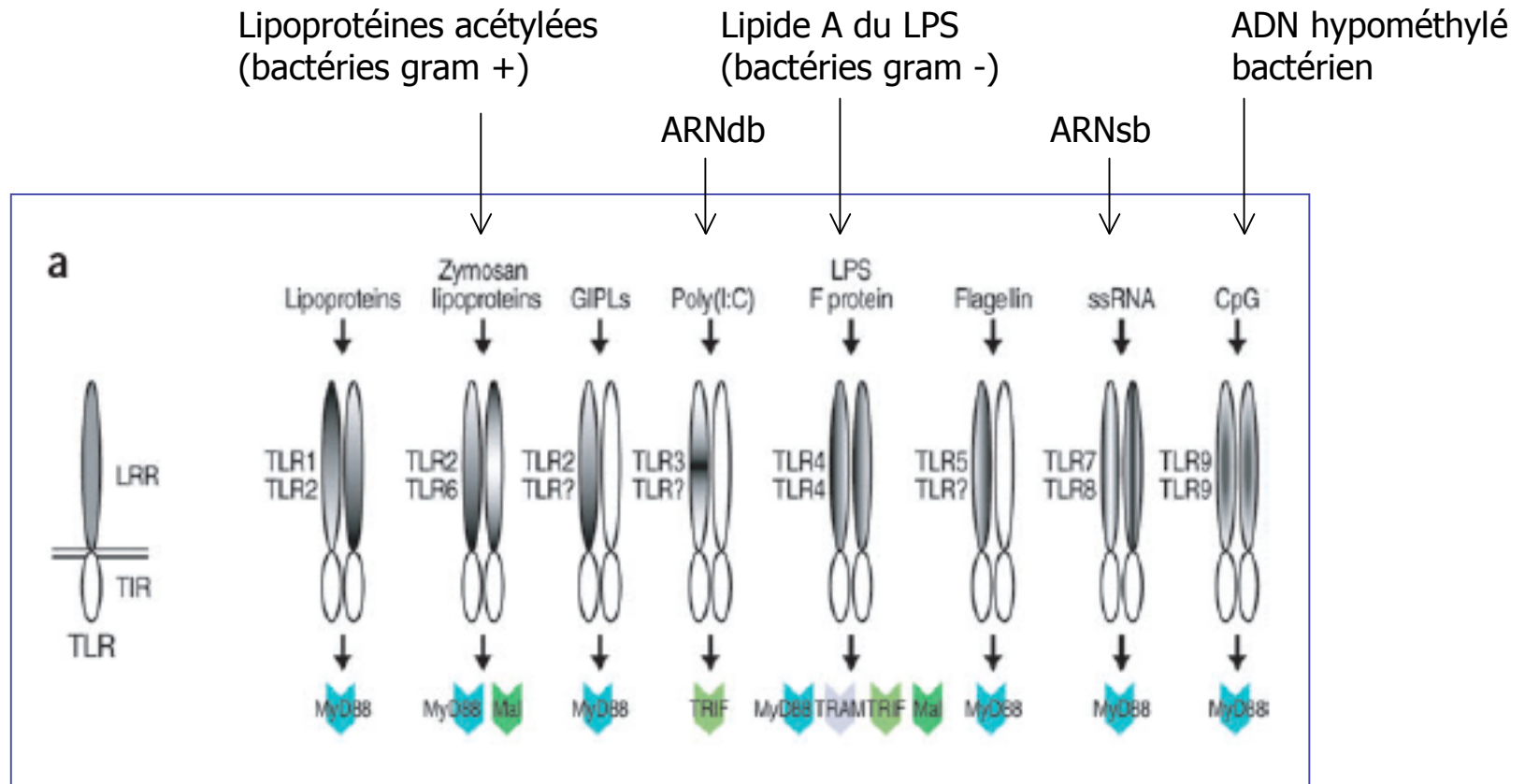
Structure des récepteurs de la famille IL-1R/TLR



Domaine **TIR**: Toll/Interleukin-1R domain

Interaction homotypiques entre TLR et adaptateurs moléculaires contenant des domaines TIR

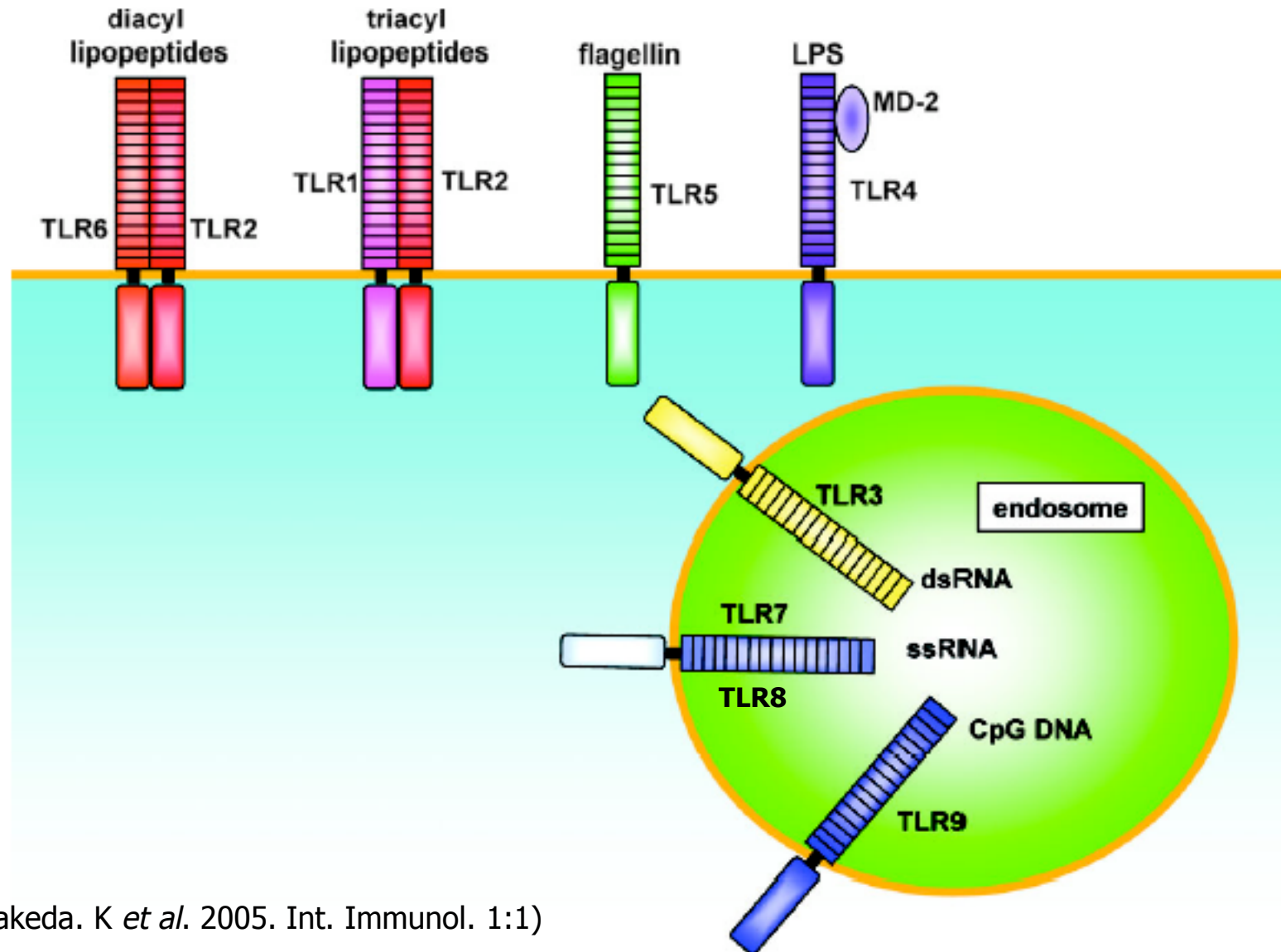
Structure des TLR et leurs ligands



Domaine LRR: très conservé, site de fixation des ligands ou de fixation des co-récepteurs

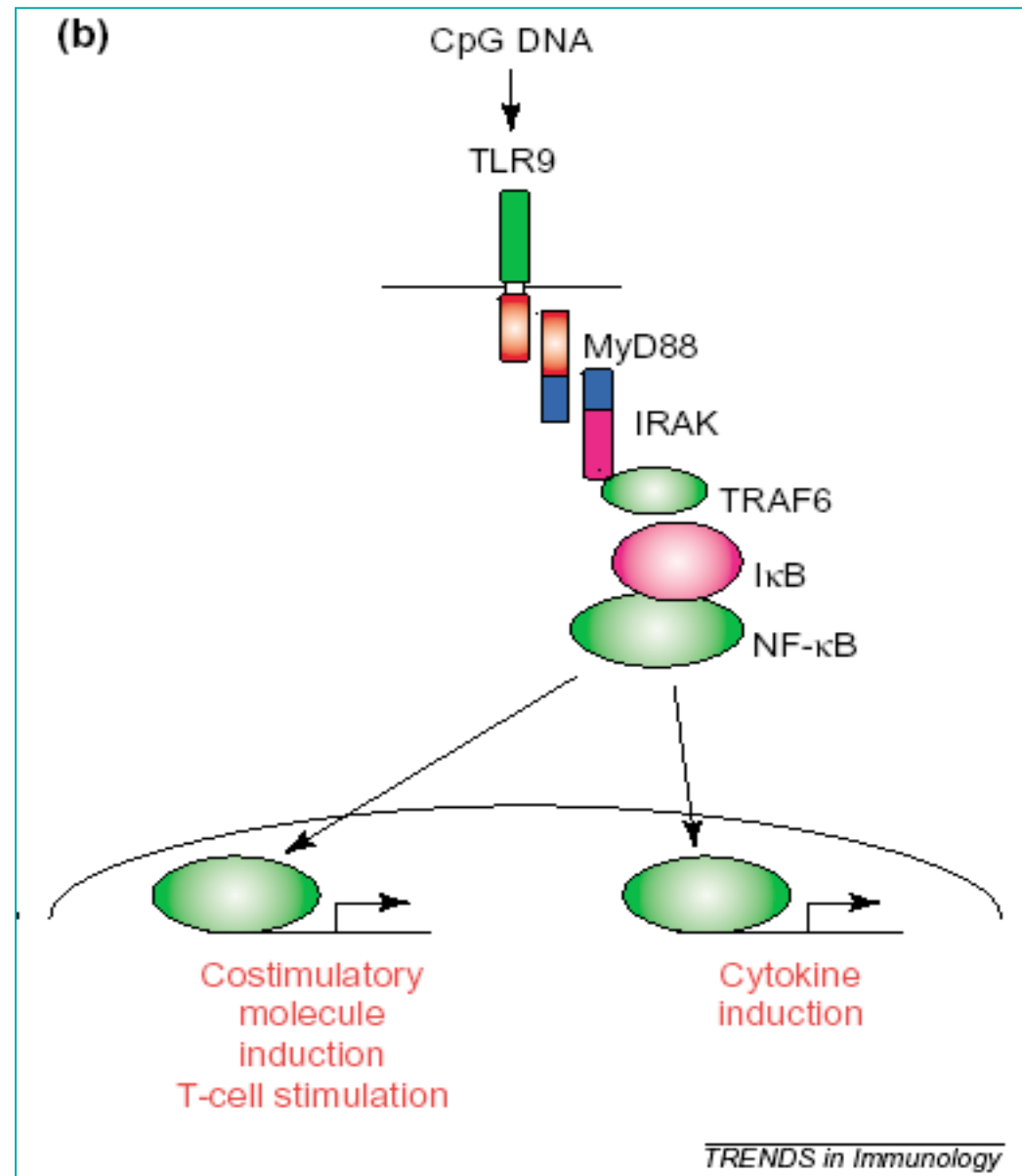
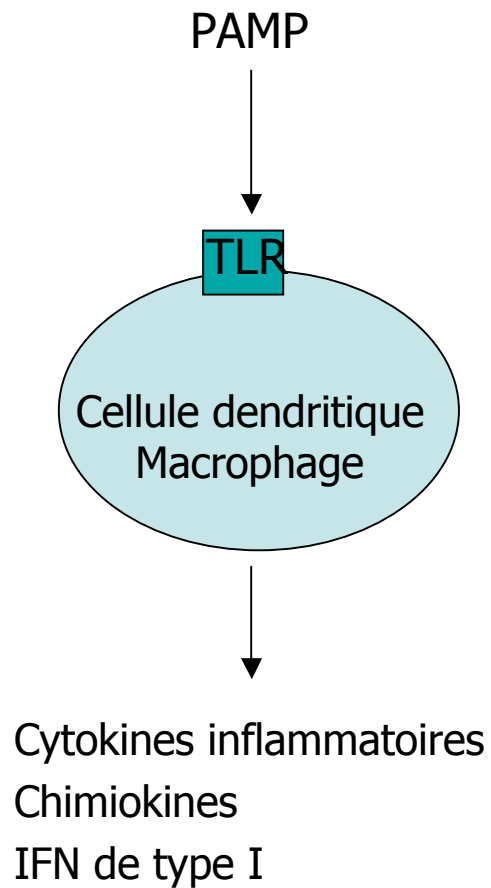
Domaine TIR: formation du complexe de signalisation

Expression en surface ou en intracellulaire



(Takeda. K *et al.* 2005. *Int. Immunol.* 1:1)

Transduction du signal par les TLR



(Kaisho. T *et al.* 2001. Trends Immunol. 22:78)

Molécules impliquées dans les voies de signalisation des TLR

Adaptateurs moléculaires (domaine TIR):

MyD88: utilisé par tous les TLR

TRIF = TICAM-1

TIRAP = MAL

TRAM = TICAM-2

Recrutement de combinaisons
différentes d'adaptateurs moléculaires

Kinases:

Famille de kinases IRAK (IL-1 Receptor Associated-Kinases): IRAK-1 et IRAK-4
Après phosphorylation, se dissocient des récepteurs et s'associent à TRAF6
Activation de la kinase TAK-1 (TGF Activated Kinase) , et activation de NF-κB

TOLLIP: « Toll Interacting Protein » ,

TIRAP «: Toll/IL-1R domain-containing Adaptor Protein »

IRAK: IL-1R Associated-Kinase;protéine kinase

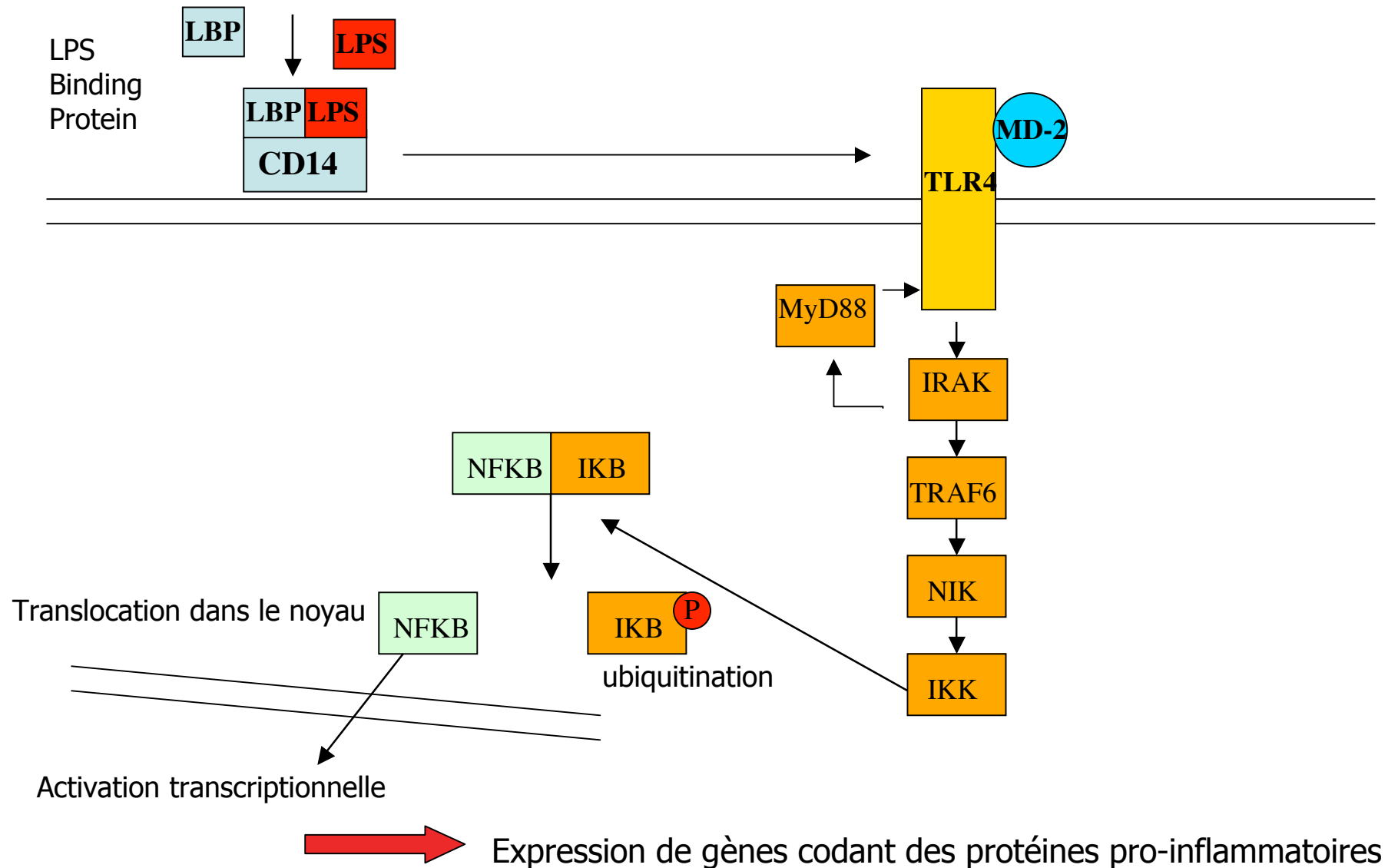
TRAF6: « TNFReceptor-Associated Factor 6 »

JNK: « c-Jun N terminal Kinase »

TAK1: «TGF Activated Kinase »

P38: MAP kinase

Exemple: Activation de TLR4 par le LPS



Mutations dans la voie de réponse au LPS

Mutation *lps*: affecte le récepteur TLR4

Souris C3H/HeJ: mutation ponctuelle dans le domaine TIR du gène *TLR4*

Souris TLR4-/-

Souris CD14 -/-

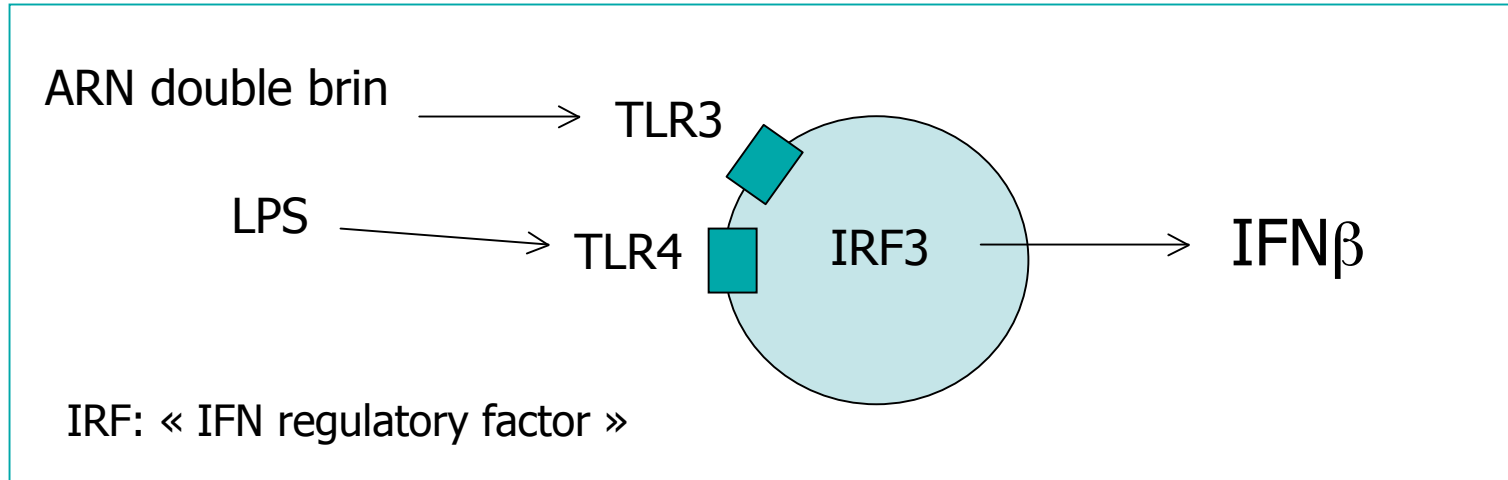
→ Ces souris présentent une forte susceptibilité aux infections par les bactéries à gram négatif

Résistantes au LPS (absence de choc septique)

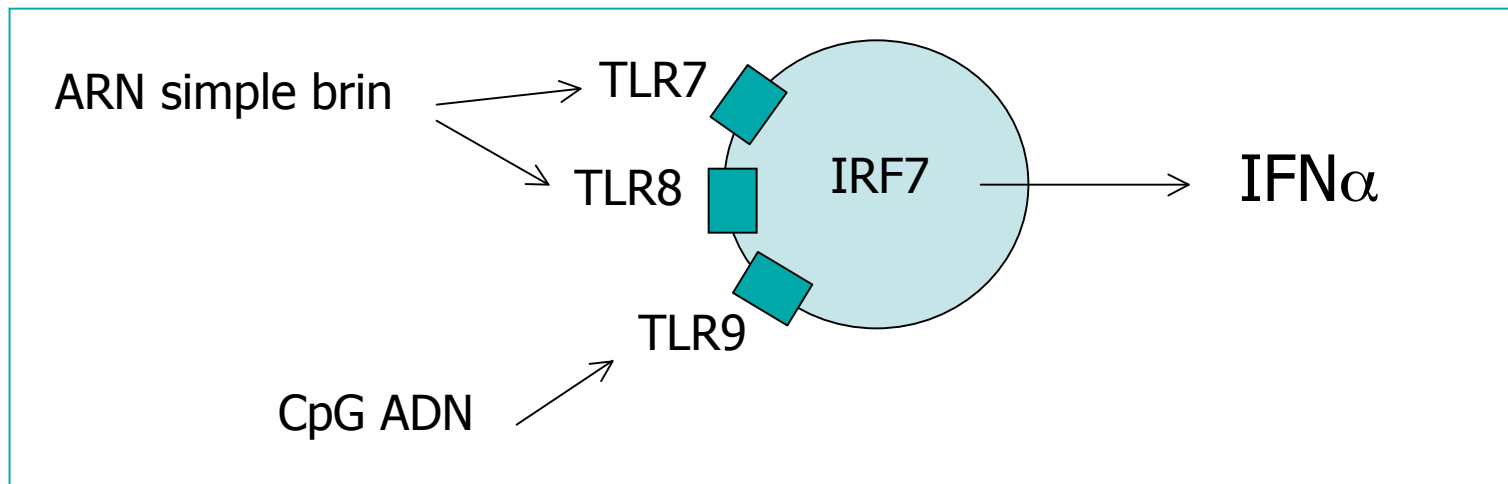
TLR2 et TLR4 permettent de discriminer entre les infections bactériennes à Gram- et à Gram+

	Réponse au		Susceptibilité accrue aux infections bactériennes
	LPS	PG	
TLR4-/-	non	normal	Gram-
TLR2-/-	normal	non	Gram+
MyD88-/-	non	non	Gram- et Gram+
+/+	normal	normal	non

Régulation de la production des IFN de type I par les TLR

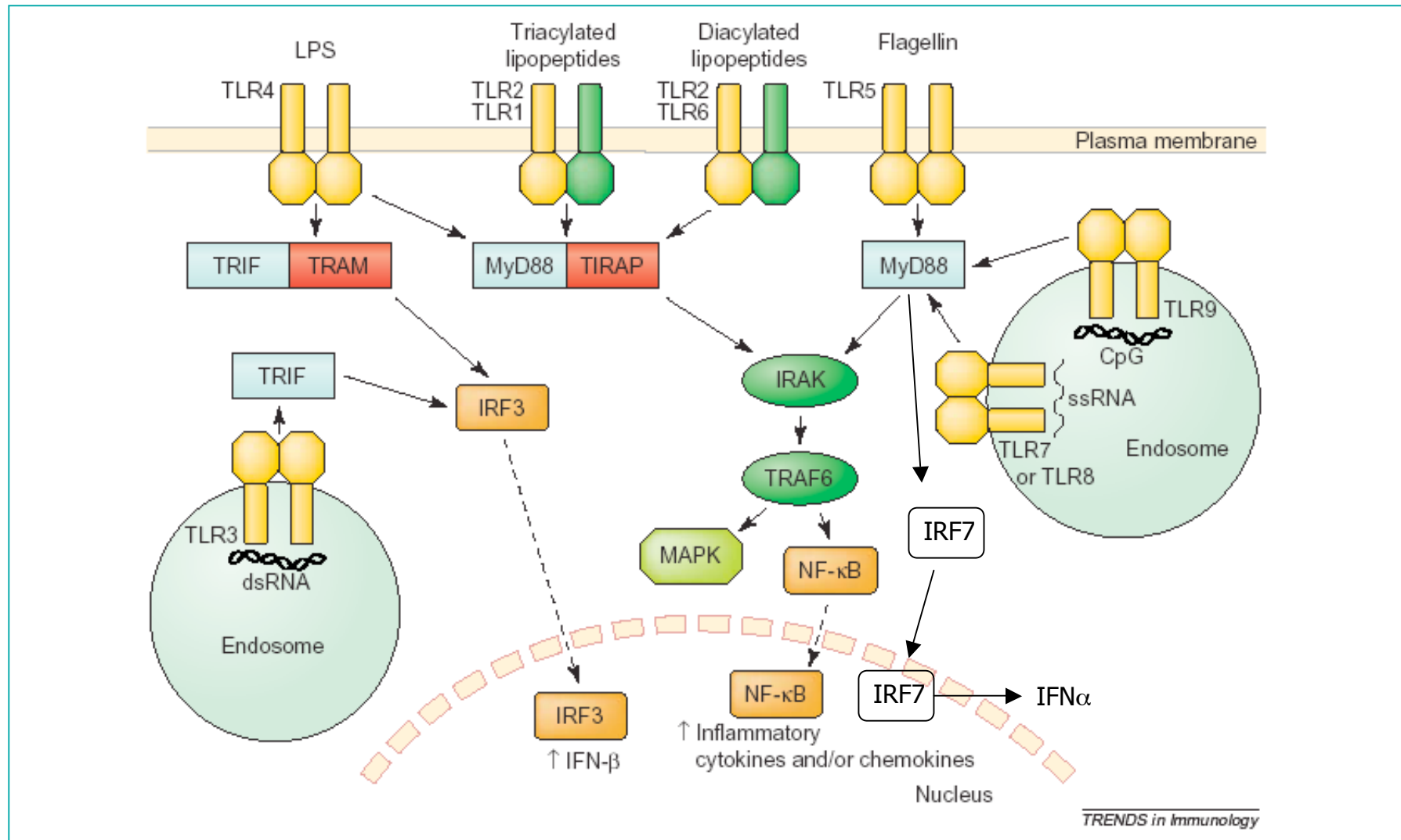


Activation IRF3 par kinase TBK-1, indépendante de MyD88, dépendante de Trif



MyD88 forme un complexe avec IRF7 et TRAF6 (mais pas avec IRF3)

Vue générale des voies de signalisation par les TLR



(Van Duin D. et al. 2005 Trends in immunol.)

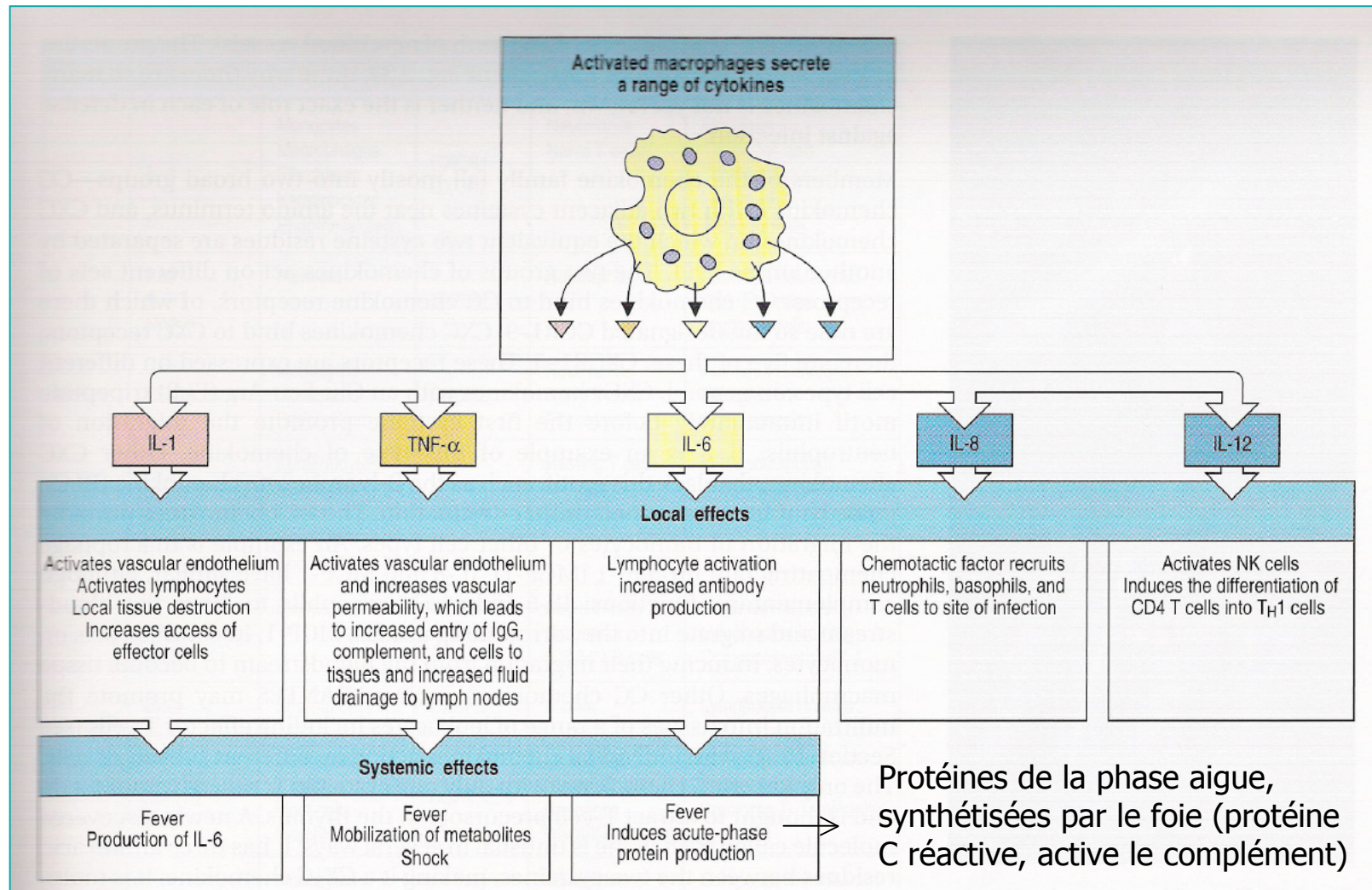
Conséquences de l'activation des TLR

Inflammation: Production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires
TNF- α , IL-6, IL-12 et IL-8

Réponse antivirale: Production d'IFN de type I, IFN- α et IFN- β

Activation de l'immunité adaptative: Production IFN de type I, IL-12, augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation (CD80, CD86) et maturation des CPA (rôle important des cellules dendritiques)

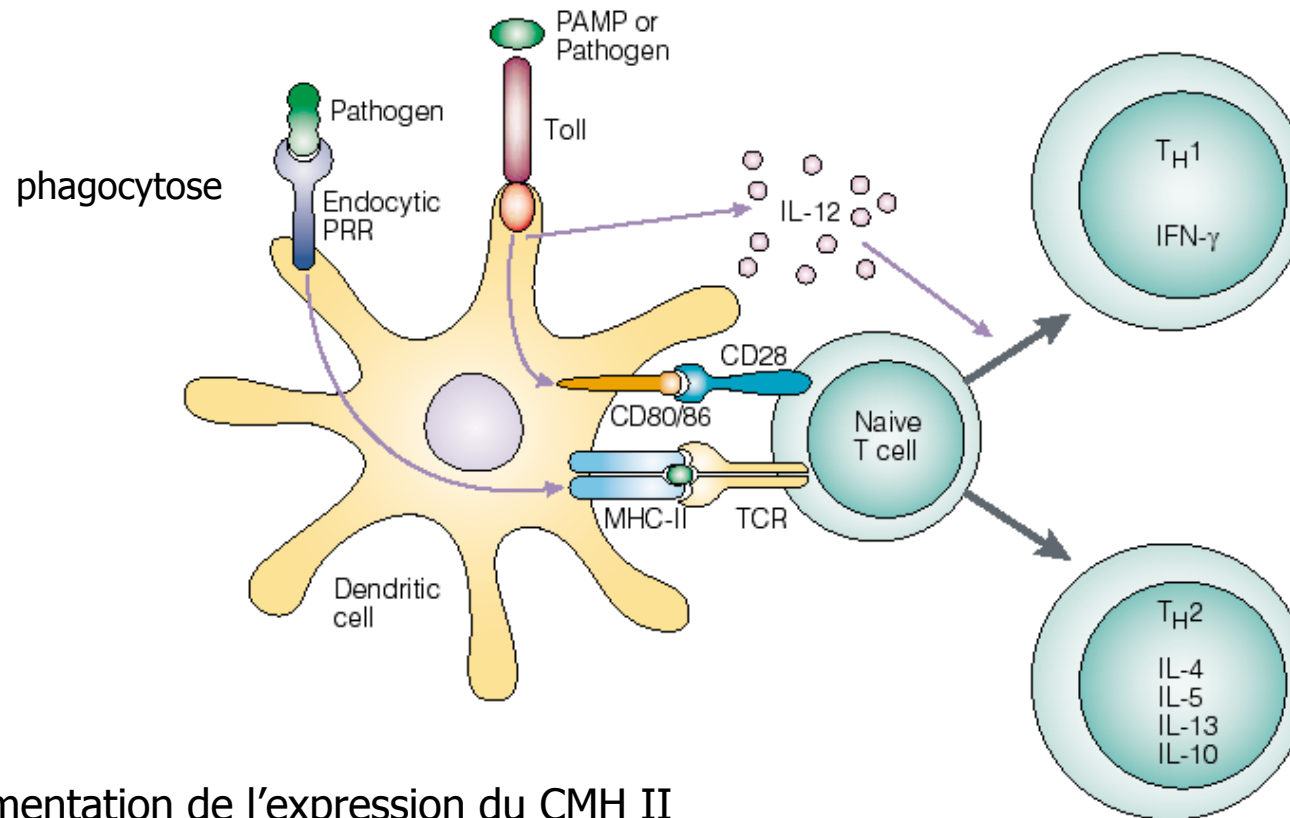
Cytokines inflammatoires sécrétées par les macrophages activés



Activation de l'immunité adaptative

- Les cellules professionnelles présentatrices d'antigène (CPA) sont les cellules dendritiques
- Elles expriment des PRR et notamment des TLR
- Ces cellules ont un rôle majeur de couplage entre l'immunité innée et adaptative
- Les cellules dendritiques immatures localisées dans les tissus (en périphérie), qui sont les portes d'entrée des micro-organismes
- Après entrée d'un pathogène dans l'organisme, il y a une reconnaissance des PAMPs par les TLR des cellules dendritiques, ce qui induit leur maturation
- Les cellules dendritiques matures expriment fortement les molécules de co-stimulation (CD40, CD80 et CD86) et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, où elles vont présenter les antigènes dérivant des pathogènes aux lymphocytes T naïfs, et les activer.

Contrôle de l'immunité adaptative



- Augmentation de l'expression du CMH II
- Augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86
- Sécrétion IL-12
- Modification de l'expression des récepteurs de chimiokines (migration cellulaire)

(Medzhitov R. *et al.* 2001. Nature Rev. Immunol. 1:135)

MyD88 requis pour la maturation des DC

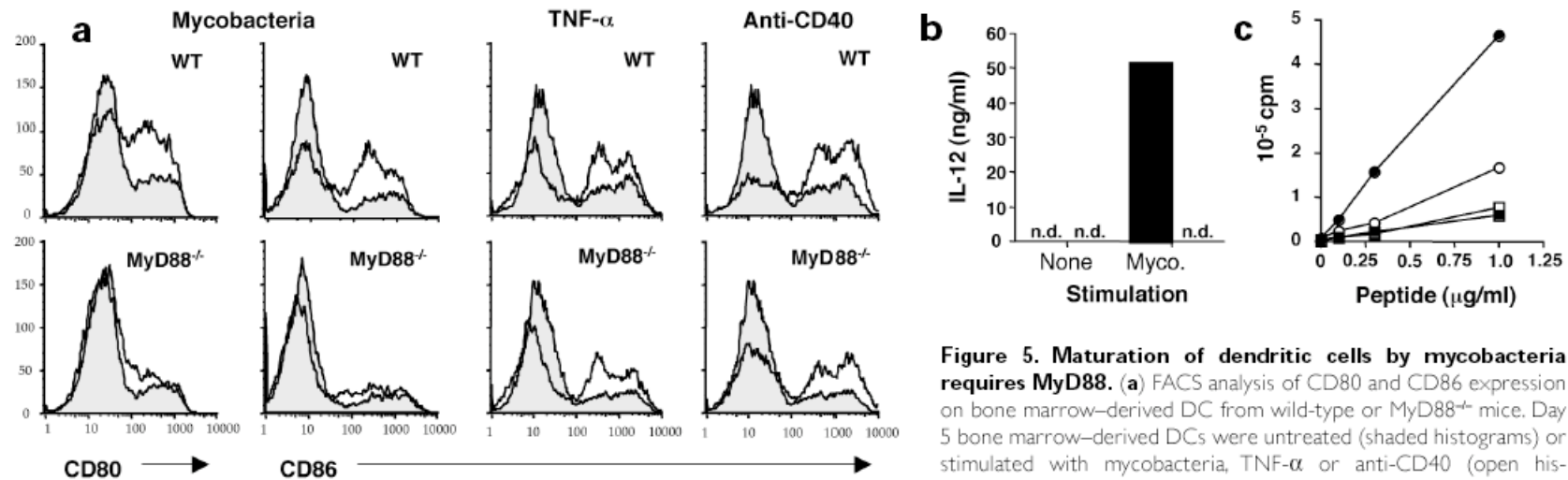
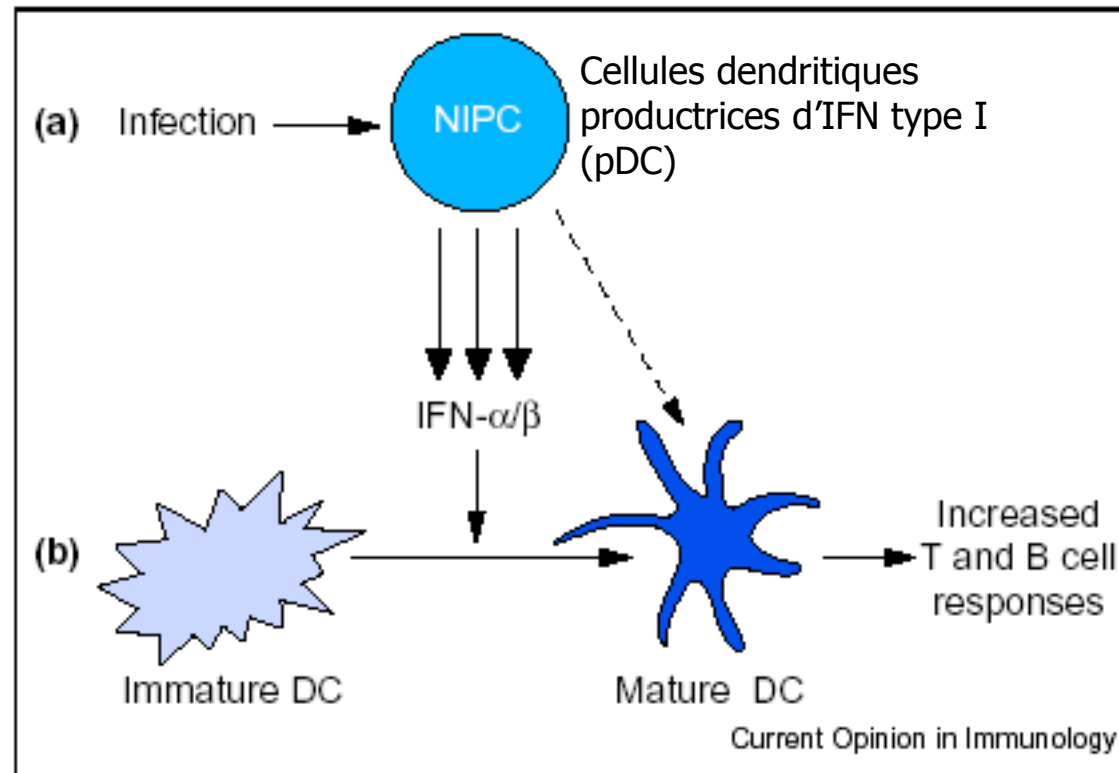


Figure 5. Maturation of dendritic cells by mycobacteria requires MyD88. (a) FACS analysis of CD80 and CD86 expression on bone marrow-derived DC from wild-type or MyD88^{-/-} mice. Day 5 bone marrow-derived DCs were untreated (shaded histograms) or stimulated with mycobacteria, TNF- α or anti-CD40 (open histograms) for 24 h. WT, wild-type. (b) Quantification of IL-12 production by wild-type (filled bar) and MyD88^{-/-} (n.d.) DCs after stimulation with mycobacteria. Supernatants were diluted 1:100. n.d., not detected. (c) Mycobacteria-treated MyD88-deficient DCs did not efficiently stimulate T cell proliferation. TCR-transgenic CD4⁺ T cells were incubated with fixed wild-type (filled symbols) or MyD88-deficient (open symbols) DCs, treated with (circles) or without (squares) mycobacteria and pulsed with different concentrations of cognate peptide. After 24 h, proliferation was measured, by [³H]thymidine incorporation, for an additional 24 h.

- a. MyD88^{-/-}: Pas de maturation (CD80, CD86) en réponse aux mycobactéries
- b. MyD88^{-/-}: Défaut de production d'IL-12 par les DC
- c. MyD88^{-/-}: Pas de stimulation des LT CD4+

Rôle des IFN dans l'induction de l'immunité adaptative



IFN- α/β links innate and adaptive immunity. **(a)** Virus infection results in the secretion of large quantities of IFN- α/β by NIPCs, and probably also results in the maturation of these cells into DCs. IFN- α/β acts both as an innate effector in the control of virus replication and as an activator of DCs. **(b)** Immature DCs exposed to IFN- α/β become potent APCs capable of initiating T and B cell responses.

(Le bon A. *et al.* 2002 current opinion in immunology 14:432)

TLR et immunité adaptative

nature

Vol 438|17 November 2005|doi:10.1038/nature04267

LETTERS

Control of B-cell responses by Toll-like receptors

Chandrashekhar Pasare¹ & Ruslan Medzhitov¹

Toll-like receptors (TLRs) detect microbial infection and have an essential role in the induction of immune responses^{1–3}. TLRs can directly induce innate host defence responses, but the mechanisms of TLR-mediated control of adaptive immunity are not fully understood. Although TLR-induced dendritic cell maturation is required for activation of T-helper (T_H) cells⁴, the role of TLRs in B-cell activation and antibody production *in vivo* is not yet known. Here we show that activation and differentiation of T_H cells is not sufficient for the induction of T-dependent B-cell responses. We find that, in addition to CD4⁺ T-cell help, generation of T-dependent antigen-specific antibody responses requires activation of TLRs in B cells.

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) is a TLR signalling adaptor critical for TLR-dependent induction of adaptive immune responses^{5,6}. T_H cell activation and production of interferon (IFN)- γ are deficient in MyD88 knockout mice^{3,5,6}. Consistent with this defect in T_H cell activation, antigen-specific IgM and IgG1 antibody responses to T-dependent antigens are considerably reduced, whereas IgG2 antibody responses are completely abolished in MyD88 knockout mice (Fig. 1a and data not shown). The steady-state levels of total serum IgM, IgG1, IgG2c and IgG3 in naive MyD88 knockout mice are reduced compared to levels in wild-type mice (Supplementary Fig. 1), despite the fact that B-cell populations are normal and phenotypically comparable between these mice

Régulation de l'activation des TLR

La signalisation par les TLR est normalement régulée
3 mécanismes de régulation sont connus:

récepteurs leurres solubles:

TLR2s et TLR4s

régulateurs transmembranaires:

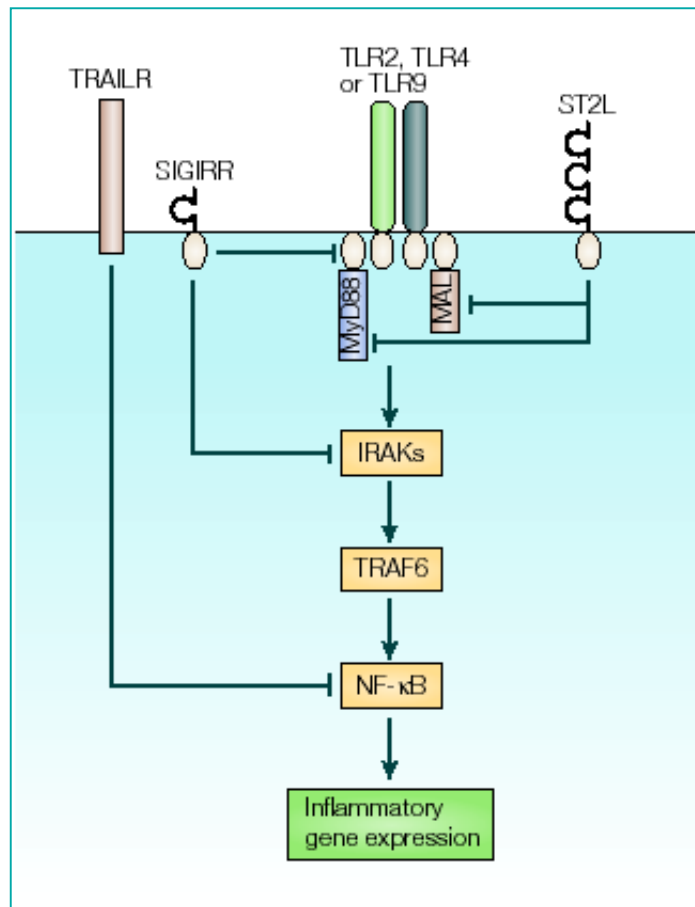
ST2L
SIGIRR
TRAILR

régulateurs intracellulaires:

MyD88s	A20
IRAKM	IRF4
SOCS1	Dok1, Dok2
TOLLIP	

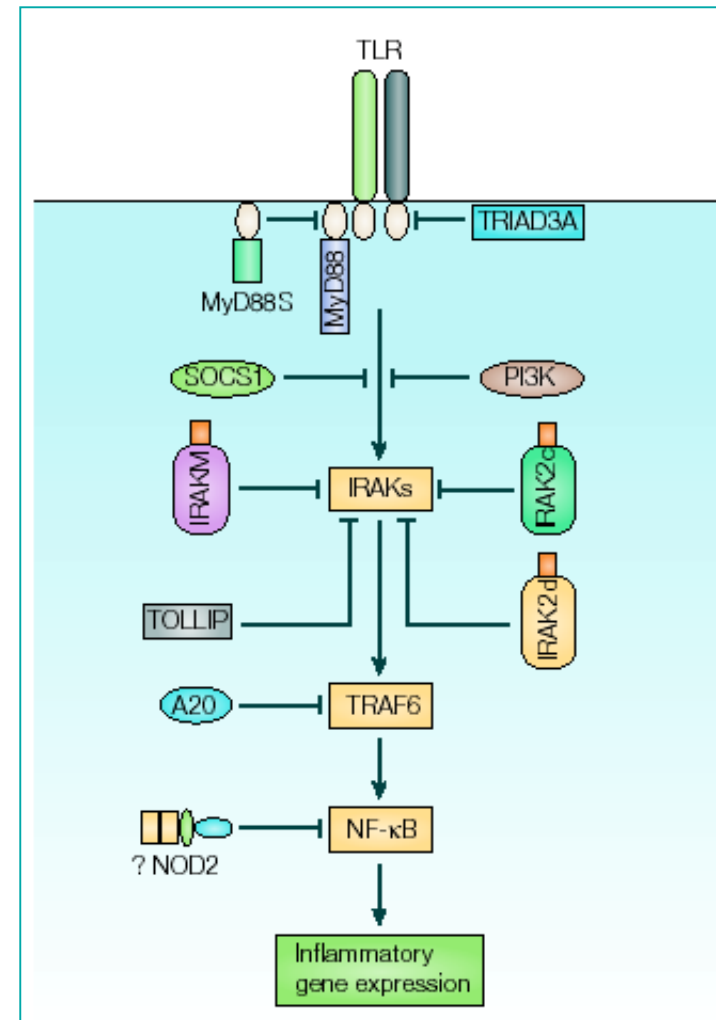
Action des régulateurs négatifs des TLR

Régulateurs membranaires



(Liew F.Y. et al. 2005 nature rev. Immunol. 5:446)

Régulateurs intracellulaires



Mise en évidence expérimentale du rôle de régulateur négatif de Dok1 et Dok2

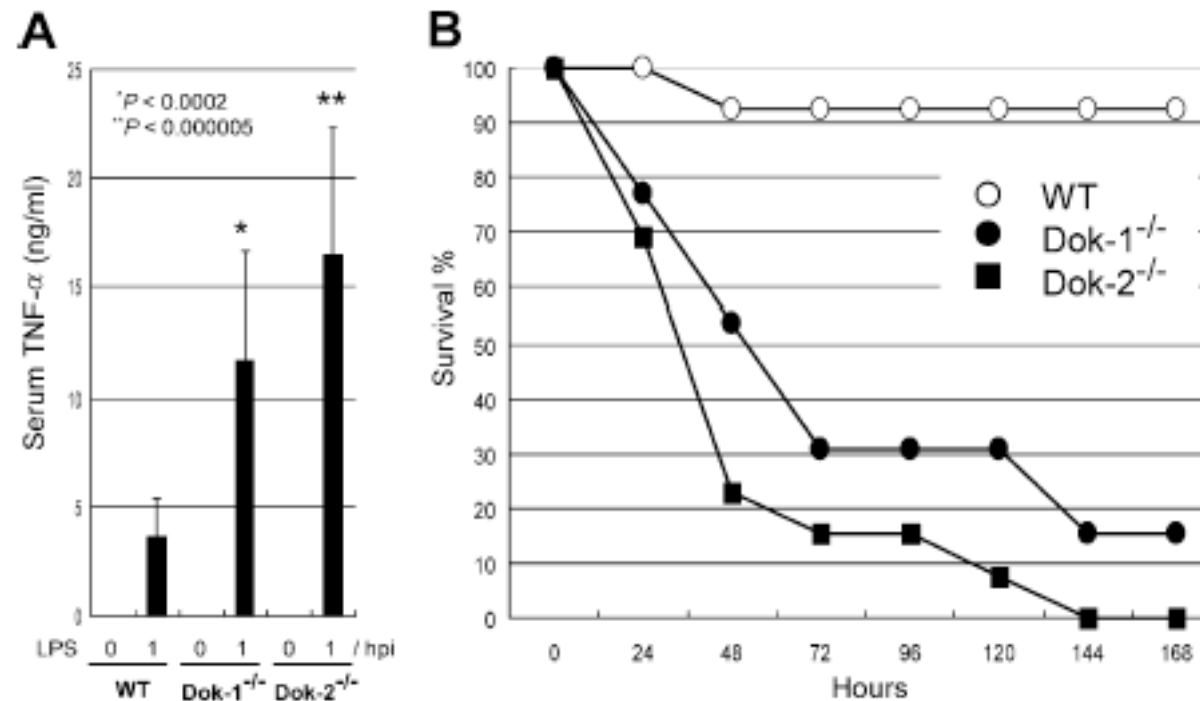
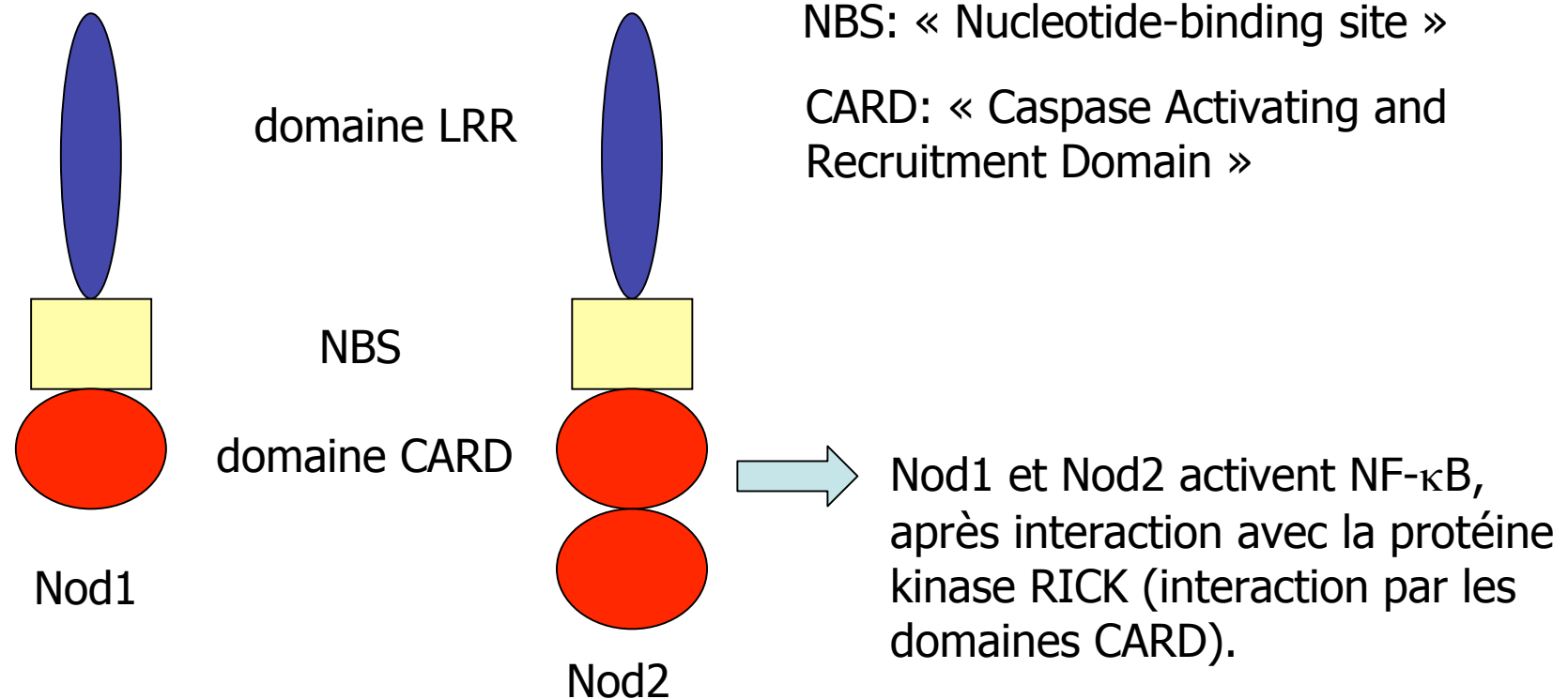


Figure 4. Mice lacking Dok-1 or Dok-2 are hypersensitive to LPS. (A) Serum concentration of TNF- α of 8-wk-old mice at 1 h after injection (1 hpi) with LPS to the peritoneal cavity or before it (0 hpi) was examined with ELISA and shown with SD ($n = 7-13$). The maximal p-value compared with the wild-type is indicated. (B) Mice at 8 wk of age ($n = 13$ for each) were injected with LPS as in A and monitored up to 7 d. Data representative of duplicate experiments are shown.

Les récepteurs Nods intracellulaires

Nods : « Nucleotide-binding Oligomerization Domain proteins »
Récemment caractérisés (2002), ils reconnaissent des PAMPs intracellulaires

Structure



Fonction des récepteurs Nods

- Les gènes Nod, comme les TLR sont très anciens (ont été conservés au cours de l'évolution), et sont retrouvés dans des organismes divers incluant les plantes, les insectes et les mammifères.
- Chez l'homme, 8 membres de la famille des protéines NODs ont été identifiés.
- Localisation intracellulaire, dans les cellules épithéliales
- Pour la majorité des récepteurs Nods, les ligands ne sont pas connus.
- Nod1 et Nod2 reconnaissent des motifs de peptidoglycanes (bactéries gram+ pour Nod1 et Gram + et - pour Nod2).

Pathologie: déficiences dans les voies de signalisation des TLR

Pyogenic Bacterial Infections in Humans with IRAK-4 Deficiency

Capucine Picard,¹ Anne Puel,¹ Marion Bonnet,¹ Cheng-Lung Ku,¹
Jacinta Bustamante,¹ Kun Yang,¹ Claire Soudais,¹
Stéphanie Dupuis,¹ Jacqueline Feinberg,¹ Claire Fieschi,¹
Carole Elbim,² Remi Hitchcock,³ David Lammas,⁴
Graham Davies,⁵ Abdulaziz Al-Ghonaum,⁶ Hassan Al-Rayes,⁶
Sulaiman Al-Jumaah,⁶ Sami Al-Hajjar,⁶ Ibrahim Zaid Al-Mohsen,⁶
Husn H. Frayha,⁶ Rajivi Rucker,³ Thomas R. Hawn,⁷
Alan Aderem,⁷ Haysam Tufenkeji,⁶ Soichi Haraguchi,³
Noorbibi K. Day,³ Robert A. Good,³
Marie-Anne Gougerot-Pocidalo,² Adrian Ozinsky,⁷
Jean-Laurent Casanova^{1,8*}

Members of the Toll-like receptor (TLR) and interleukin-1 receptor (IL-1R) superfamily share an intracytoplasmic Toll-IL-1 receptor (TIR) domain, which mediates recruitment of the interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) complex via TIR-containing adapter molecules. We describe three unrelated children with inherited IRAK-4 deficiency. Their blood and fibroblast cells did not activate nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) and failed to induce downstream cytokines in response to any of the known ligands of TIR-bearing receptors. The otherwise healthy children developed infections caused by pyogenic bacteria. These findings suggest that, in humans, the TIR-IRAK signaling pathway is crucial for protective immunity against specific bacteria but is redundant against most other microorganisms.

genic bacteria were the only microorganisms responsible for infection. Gram-positive *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* were the most frequently found and were the only pathogens identified in two patients. The infections began early in life but became less frequent with age, and the patients (now aged 6, 11, and 7 years) are well with no treatment. All known primary immunodeficiencies were excluded. In particular, the patients had normal serum antibody titers against protein and polysaccharide antigens, including those from *S. pneumoniae*. However, one of our three patients (P3) had previously been shown not to respond to lipopolysaccharide (LPS) and *Staphylococcus aureus* (17). The phenotype of the three patients was similar to that of another child described elsewhere, with impaired responses to lipopolysaccharide (LPS) and IL-1 β , but not to tumor necrosis factor- α (TNF α) (18). This suggested that our three patients might be suffering from impaired TIR pathway signaling.

We first tested the response of the patients' monocytes to LPS, which is predominantly detected via TLR4 (19, 20). As P3 did, neither P1

¹Laboratoire de Génétique Humaine des Maladies Infectieuses, Université René Descartes-INSERM U550, Faculté Necker. 156 rue de Vaugirard. 75015 Paris.

Défaut de réponse aux ligands des TLR chez 2 patients

Patients ayant des infections récurrentes à *streptococcus-pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*.
Réponse inflammatoire faible

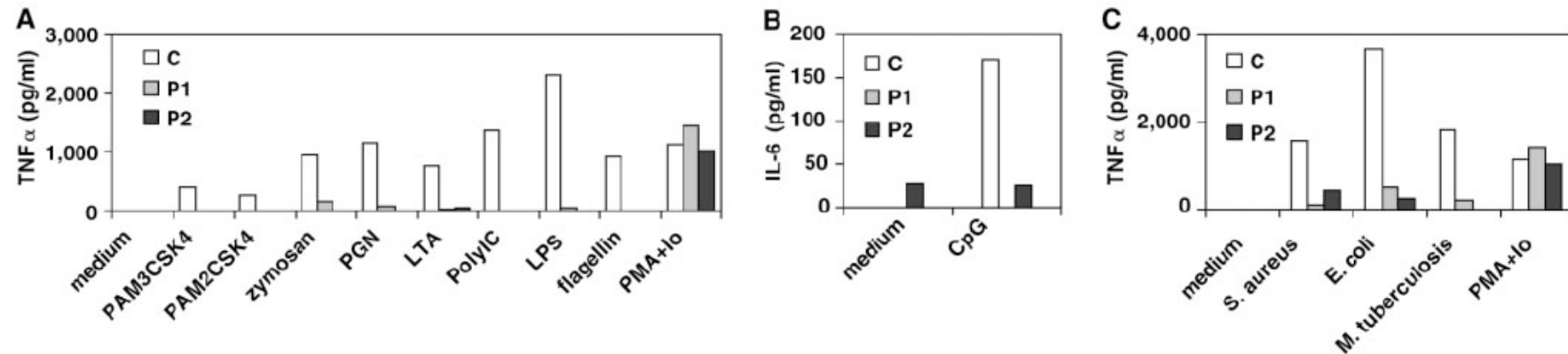
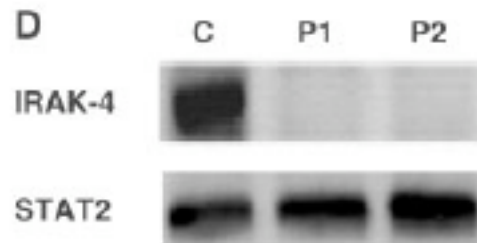


Fig. 2. Impaired responses of blood cells to TLR ligands and bacterial stimuli. (A to C) are representative of two independent experiments with cells from a healthy control (labeled C) and patients P1 and P2. (A) TNFα production in the supernatants of cultured whole blood cells stimulated for 24 hours with TLR ligands PAM₃CSK₄, PAM₂CSK₄, zymosan, PGN, LTA, Poly(I:C), LPS, and flagellin (see methods for the respective concentra-

tions), as measured by ELISA. (B) IL-6 production in the supernatants of peripheral blood mononuclear cells stimulated for 24 hours with CpG DNA, as measured by ELISA. (C) TNFα production in the supernatants of cultured whole blood cells treated with several bacterial stimuli (heat-killed *S. aureus*, *E. coli*, and H37Rv *M. tuberculosis*) or PMA-ionomycin, as measured by ELISA.



Western blot

Mutations IRAK-4/NEMO/I κ B α

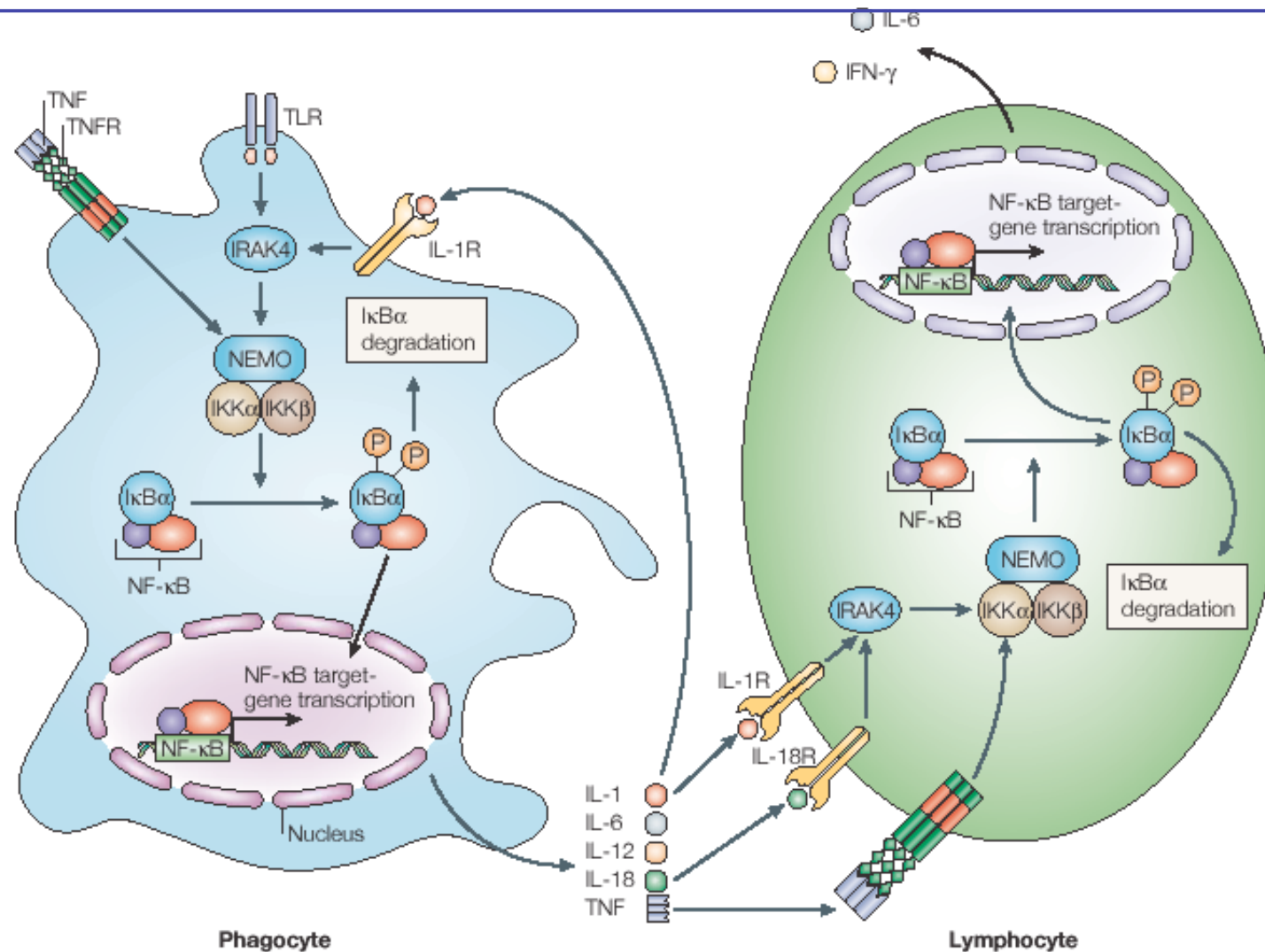


Figure 2 | A schematic showing the involvement of IRAK4, NEMO and I κ B α , and the TIR and NF- κ B signalling pathways downstream from TLR, IL-1R and TNFR superfamily members. Dendritic cells and macrophages normally

(Casanova J.L. *et al.* 2004 nature rev. Immunol. 4:55)

Conclusions

Immunité innée:



- Reconnaissance de motifs PAMPs
- Transduction des signaux dans la cellule
- Phase effectrice 1: Induction de l'inflammation, phagocytose
- Phase effectrice 2: Induction de la maturation des CPA



Inflammation chronique: conséquences pathologiques
Défaut de signalisation dans voies TLR: sensibilité aux infections
Importance de la régulation négative

Protocoles de vaccination ciblent les TLR (adjuvants)