

## Les superantigènes bactériens : agents pathogènes ou outils thérapeutiques

Les entérotoxines, qui provoquent l'empoisonnement alimentaire causé par *Staphylococcus aureus*, sont des superantigènes. Leurs propriétés au sein du système immunitaire en font des molécules potentiellement dévastatrices dont le rôle dans le développement des maladies auto-immunitaires ne serait pas négligeable. Il semble possible de détourner ces effets néfastes pour éventuellement tirer parti du caractère immunomodulateur des superantigènes modifiés. On disposerait alors d'outils thérapeutiques susceptibles de traiter de nombreuses pathologies.

---

Jacques Thibodeau  
Gilbert Croteau  
Nathalie Labrecque  
Rafick-Pierre Sékaly

---

### ADRESSE

J. Thibodeau : étudiant postdoctoral, laboratoire d'immunologie, IRCM.

G. Croteau : chercheur, Bio-Méga, Inc.

N. Labrecque : étudiante au doctorat.

R.-P. Sékaly : directeur, laboratoire d'immunologie, IRCM, département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal.

La plupart des bactéries qui colonisent l'organisme humain sont inoffensives ; des barrières naturelles, comme les cellules épithéliales ou le système immunitaire, les empêchent aussitôt de proliférer. Ces bactéries deviennent pathogènes lorsque le système immunitaire s'affaiblit, lorsqu'elles traversent les obstacles physiques comme la peau, ou encore lorsqu'elles synthétisent de nouvelles substances extracellulaires associées à des mécanismes de toxicité. Certaines de ces exoprotéines ont une activité catalytique leur permettant par exemple de modifier des molécules à la surface des cellules de l'hôte et d'augmenter ainsi leur pouvoir d'invasion [1]. Cependant, d'autres sont des superantigènes : elles déclenchent dans le système immunitaire une cascade complexe de réactions qui risquent d'aboutir au choc toxique [2]. Elles stimulent *in vitro* et *in vivo* la prolifération et la différenciation d'une très large proportion des cellules T (10-40 %), contrairement aux antigènes conventionnels qui stimulent moins de 0,01 % des lymphocytes. Ces molécules, efficaces à des concentrations extrêmement faibles ( $10^{-9}$  M), font partie des mitogènes les plus puissants des cellules T. Les mécanismes de leur toxicité impliquent 1) une prolifération lymphocytaire accompagnée de la synthèse de lymphokines (interleukines-1 et -2, cachectines), 2) le relargage de leucotriènes produites par les cellules mastocytaires [2, 3]. Paradoxalement cette stimulation massive mais incontrôlée du système immunitaire entraînerait une immunosuppression dont la bactérie tire avantage. Plusieurs molécules bactériennes dotées de propriétés superantigéniques ont été décrites (Tableau I) ; les plus étudiées toutefois sont les entérotoxines produites par *Staphylococcus aureus*. Nous

examinons principalement ici les propriétés de ces toxines. Nous analysons en détail leur structure, ainsi que leurs interactions avec différents ligands des cellules hôtes.

### Propriétés physico-chimiques des entérotoxines

Des colonies de bactéries de la famille *Staphylococcus aureus* occupent la peau de façon naturelle. Différentes souches produisent des exotoxines dont on connaît plusieurs sérotypes (A, B, C1, C2, C3, D, E). L'ingestion d'aliments mal conservés et contaminés par une souche de *S. aureus*, court-circuite les barrières naturelles et expose l'hôte aux effets de ces exotoxines. Ces molécules sont responsables de près de 25 % des empoisonnements alimentaires et des dérangements entériques [4]. Les entérotoxines sont relativement résistantes à la protéolyse et pratiquement insensibles à la chaleur. Elles ont une masse moléculaire relative variant de 26 000 à 30 000. Elles peuvent partager jusqu'à 90 % de similitude au niveau de leur structure primaire comme c'est le cas entre SEA et SEE [2]. Elles comportent une faible proportion d'hélices  $\alpha$ , mais plusieurs feuillets  $\beta$  [5]. La présence de résidus de cystéines permet la formation d'un pont disulfure qui prend l'aspect d'une courte boucle en position centrale dans plusieurs de ces molécules.

Dans les années 80, une entérotoxine de *S. aureus* ne possédant pas de pont disulfure a été identifiée. Il s'agit de la toxine du syndrome du choc toxique (TSST-1). Elle diffère beaucoup des autres entérotoxines avec lesquelles elle ne partage guère que 45 % de similitude. Cette toxine ne provoque pas systématiquement d'effets entérotoxiques chez le singe ; en revanche, elle affecte de façon significative l'organisme humain ; par exemple, elle est associée chez la femme au choc toxique que causent certains tampons hygiéniques. Les gènes codant pour ces molécules sont chromosomiques ou plasmidiques. Certains (SEA et SPEA) sont localisés sur des bactériophages intégrés dans le génome bactérien et sont donc « mobiles » [1].

### Propriétés biologiques des entérotoxines

On est loin d'avoir prouvé que les entérotoxines absorbées par un humain passent dans la circulation. Cependant, des singes auxquels on a fait ingérer des entérotoxines ont produit des anticorps protecteurs. La quantité de toxines retrouvée dans les fluides biologiques est à peine détectable ; ces toxines seraient rapidement éliminées par l'organisme. Ainsi, lorsque des singes subissent des injections de SEB, 60 % de la dose disparaît en 60 secondes et 90 % en une heure. Même si les entérotoxines ne sont pas excrétées, les reins constitueraient les principaux sites de dégradation. Les entérotoxines sont également absorbées par la peau. Le contact avec les entérotoxines peut produire des éruptions cutanées avec formation de vésicules suivies, sept jours plus tard, de desquamations des paumes [4]. Quelques heures après l'ingestion d'aliments contaminés, apparaissent les symptômes classiques de l'empoisonnement alimentaire : nausées, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée, maux de tête et crampes. Contrairement aux entérotoxines produites par d'autres bactéries, leur action ne se limite pas au tractus intestinal. A des concentrations beaucoup plus faibles que celles ayant lieu par la voie gastrique, l'administration intraveineuse de ces toxines à des animaux provoque vomissements et diarrhées. Seuls les humains et les singes sont sensibles aux entérotoxines, on note toutefois que les souris préalablement sensibilisées au D-galactosamine (composé qui augmente leur susceptibilité aux médiateurs endogènes comme le TNF) subissent un choc léthal après une injection intraveineuse de SEB [6].

On a commencé à s'intéresser vraiment aux propriétés immunologiques des entérotoxines qu'après avoir découvert leur activité mitogénique sur les lymphocytes. Les premières études ont montré que des lymphocytes périphériques humains et des cellules de rate de souris se multipliaient en présence de SEB [7]. En réalité, ce sont les lymphocytes T, aussi bien cytotoxiques (Tc) qu'auxiliaires (Th), qui sont activés par ces superantigènes. La prolifération des cellules T

### RÉFÉRENCES

1. Iandolo JJ. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Ann Rev Microbiol* 1992 ; 43 : 375-402.
2. Marrack P, Kappler J. The Staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 1990 ; 248 : 705-11.
3. Fleischer B. Bacterial toxins as probes for the T-cell antigen receptor. *Immunol Today* 1989 ; 10 : 262-4.
4. Bergdoll MS. The staphylococcal enterotoxins-an update. In : Fisher G., ed. New York : Verlag, 1985 ; 247-54.
5. Swaminathan SS, Furey W, Pletcher J, Sax M. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin B, a superantigen. *Nature* 1992 ; 359 : 801-6.
6. Miethke T, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H. T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B : critical role of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 91-8.
7. Janeway CA, Yagi J, Conrad PJ, Katz ME, Jones B, Vroegop S, Buxser S. T-cell responses to MIs and bacterial proteins that mimic its behavior. *Immunol Rev* 1989 ; 107 : 61-88.
8. Mollick JA, Cook RG, Rich RR. Class II MHC are specific receptors for *Staphylococcus enterotoxin A*. *Science* 1989 ; 244 : 817-9.
9. Trede NS, Geha RS, Chatila T. Transcriptional activation of IL-1  $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  genes by MHC class II ligands. *J Immunol* 1991 ; 146 : 2310-5.
10. Jett M, Brinkley W, Neill R, Gemski P, Hunt R. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys : Correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. *Inf Immun* 1990 ; 58 : 3494-9.

Tableau I							
PROPRIÉTÉS DES SUPERANTIGÈNES							
TYPE	PM (Da)	Acides Aminés	pI	PONT <sup>b</sup> S-S	Kd <sup>e</sup> (M)	vβ murines <sup>c</sup>	vβ humaines <sup>c</sup>
SEA	27,078	233	7.3	OUI	8.2 × 10 <sup>-8</sup>	1,3,11	1.1,5.3,6.3-.5,7.4,9.1,21.1 <sup>d</sup>
SEB	28,366	239	8.6	OUI	2.4 × 10 <sup>-7</sup>	3,7,8.1-.3,11,17	3,12,14,15,17,20
SEC1	27,496	239	8.6	OUI	7.4 × 10 <sup>-7</sup>	3,7,8.2-.3,11,17	12
SED	26,360	228	7.4	OUI	1.0 × 10 <sup>-6</sup>	3,7,8.1-.3,11,17	5,12
SEE	26,425	230	7.0	OUI	1.1 × 10 <sup>-5</sup>	11,15,17	5.1,6.1-.3,8,18
CPE	31,258	283	5.7	NON			
ETB	27,318	246	7.0	NON		1,3,8.2,10,11,15,17	2
MAM	27,000		> 9.0			6,8.1-.3	17
PE	66,583	613	5.9			3,5.1	?
SPEA	25,787	221	5.0				
SPEB	40,287	371	8.7	NON			
SPEC	24,354	208	6.7	NON			
TSST-1	22,049	194	7.2	NON	4.4 × 10 <sup>-7</sup>	3,4,15,17	2
YEA	> 10,000						

a. SEA à SEE, *S. aureus* entérotoxines A à E ; CPE, *Clostridium perfringens* entérotoxine ; ETB, *S. aureus* toxine exfoliative B ; MAM *Mycoplasma arthritidis* mitogène ; PE, *Pseudomonas aeruginosa* exotoxine A ; SPEA, SPEB, SPEC, *Streptococcus pyogenes* toxines A, B, C ; TSST-1, *S. aureus* toxine du syndrome du choc toxique ; YEA, *Yersinia enterocolitica* antigène.

b. Pont disulfure.

c. compilées d'après [2, 35].

d. John Fraser, communication personnelle.

e. Constante d'affinité avec HLA-DR1.

est cependant liée à la présence de cellules accessoires comme les monocytes ou les cellules B qui expriment à leur surface les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [8]. Ces molécules agissent comme récepteurs pour les superantigènes (voir plus bas). Le mécanisme par lequel les entérotoxines et les autres superantigènes provoquent des pathologies sévères n'est pas encore clarifié. Leur activité résulte d'un effet synergique aux niveaux gastro-intestinal, métabolique et immunologique.

Les effets toxiques qui se manifestent peuvent avoir pour cause la fixation des superantigènes aux cellules intestinales par le truchement des récepteurs (peut-être les antigènes de classe II ou des molécules similaires),

suivie du relargage de neuropeptides. Ces molécules provoqueraient à leur tour la sécrétion, par l'intermédiaire des mastocytes, de leucotriènes et d'histamines, cause (parmi d'autres) de vomissements et de réactions cutanées [3]. L'interaction des entérotoxines avec différents types cellulaires exprimant à leur surface des molécules de classe II, provoque la synthèse de molécules potentiellement toxiques comme la cachectine (TNF) et l'interleukine-1 [9]. L'intoxication par les entérotoxines modifie aussi les taux plasmatiques de plusieurs métabolites susceptibles de faire surgir des symptômes associés à l'intoxication [10].

Lors de l'administration intraveineuse, la toxicité est aussi causée par l'action mitogénique déclenchée sur

les lymphocytes T et la production de lymphokines. L'administration de SEB à des souris entraîne une perte de poids significative ainsi qu'une immunosuppression. Le rôle des cellules T dans ce phénomène a été mis en évidence par le groupe de Kappler et Marrack : 1) des souris nu<sup>+</sup>/nu<sup>+</sup> (donc presque entièrement dépourvues de cellules T) ou 2) des souris dépourvues de cellules capables de réagir contre SEB ou 3) des souris immunosupprimées avec la cyclosporine A, ne perdent pas de poids à la suite d'injections intrapéritonéales avec SEB [2]. L'utilisation de SEB recombinante fournit une preuve supplémentaire du rôle des cellules T dans la toxicité des entérotoxines. En effet cette molécule, rendue incapable d'interagir avec le RcT mais se liant

## RÉFÉRENCES

11. Kappler JW, Herman A, Clements J, Marrack P. Mutations defining functional regions of the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 387-96.
12. Kawabe Y, Ochi A. Programmed cell death and extrathymic reduction of V $\beta$ 8 CD4 T cells in mice tolerant to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Nature* 1991 ; 349 : 245-8.
13. Fraser JD. High affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. *Nature* 1989 ; 339 : 221-3.
14. Chintagumpala MM, Mollick JA, Rich RR. Staphylococcal toxins bind to different sites on HLA-DR. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3876-81.
15. Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell* 1990 ; 62 : 1115-21.
16. Herman A, Labrecque N, Thibodeau J, Marrack P, Kappler JW, Sekaly RP. Identification of the staphylococcal enterotoxin A superantigen binding site in the  $\beta$ 1 domain of the human histocompatibility antigen HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9954-8.
17. Fraser JD, Urban RG, Strominger JL, Robinson H. Zinc regulates the function of two superantigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5507-11.
18. Jorgensen JL, Reay PA, Ehrlich EW, Davis MM. Molecular components of T-cell recognition. *Ann Rev Immunol* 1992 ; 10 : 835-73.
19. Panina-Bordignon P, Fu X, Lanzavecchia A, Karr RW. Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J Exp Med* 1992 ; 176 : 1779-84.

toujours aux molécules de classe II, ne provoque pas de perte de poids [11]. Paradoxalement les cellules T CD4<sup>+</sup> activées par les superantigènes deviendront par la suite anergiques (paralysie fonctionnelle) ou seront éliminées par apoptose (mort cellulaire programmée) (*figure 1*) [12]. La nécessité d'une interaction entre les entérotoxines et le RcT demeure cependant à démontrer pour que se déclarent les symptômes de l'empoisonnement alimentaire et ceux des autres maladies causées par les staphylocoques.

### **Les molécules de classe II du CMH sont les récepteurs des toxines bactériennes**

Les molécules de classe II du CMH constituent le principal récepteur cellulaire des superantigènes bactériens. Elles sont exprimées de façon constitutive par les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules épithéliales du thymus et de l'épithélium intestinal. Élément de réponse immunitaire à un microbe, la fonction de ces molécules consiste à présenter des peptides antigéniques aux lymphocytes. Ce sont des molécules hétérodimériques dont chacune des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  est composée de deux portions extracellulaires similaires aux immunoglobulines. Le peptide antigénique est fixé dans une cavité formée par des hélices  $\alpha$  et des feuillettes  $\beta$  de chacune des chaînes. C'est dans cette région que sont localisés la majorité des acides aminés polymorphiques. Plusieurs équipes de recherche ont réussi à immunoprécipiter des molécules de classe II en utilisant des toxines comme SEA ou SEB, elles ont ainsi démontré clairement que les molécules de classe II étaient les récepteurs cellulaires des superantigènes bactériens [8]. Ceux-ci, contrairement aux peptides antigéniques, n'ont pas à être dégradés pour se lier aux molécules de classe II [7]. Des expériences de liaison ont démontré que les superantigènes bactériens manifestent une haute affinité avec les molécules de classe II. Le *Tableau 1* indique que cette affinité varie entre 10<sup>-5</sup> et 10<sup>-8</sup> M pour les différentes toxines. De plus, la stoechiométrie de cette

interaction indique un rapport de un pour un soit une molécule de classe II pour une molécule de toxine donnée. Les différents sérotypes de toxines de *Staphylococcus* ont pourtant des sites de contact distincts sur les molécules de classe II. Ainsi la liaison de SEA abolit la fixation subséquente de SEB et de TSST ; par contre, SEB et TSST-1 auraient des sites de liaison distincts puisqu'elles peuvent se lier simultanément au même récepteur [13, 14].

Des études exhaustives ont révélé plus tard que toutes les molécules de classe II n'interagissaient pas de façon identique avec les toxines. Chez la souris, l'allèle I-A<sup>k</sup> ne présente qu'une très faible affinité avec TSST alors que I-A<sup>b</sup> lie cette même toxine de façon très efficace. Chez l'humain, la fixation de TSST-1 par l'isotype HLA-DP est à peine détectable alors que les allèles de HLA-DR montrent une haute affinité avec TSST-1. Des observations similaires ont été rapportées pour SEA : l'allèle HLA-DR1 affiche une haute affinité avec SEA alors qu'un autre allèle, HLA-DRw53, ne peut fixer cette toxine. Ces différences ont été attribuées au polymorphisme allélique de la chaîne  $\beta$  : tous les allèles de DR s'associent à une chaîne  $\alpha$  identique. Une mutagenèse exhaustive des résidus polymorphiques localisés sur la chaîne  $\alpha$  de I-A — impliqués dans la présentation des peptides antigéniques aux cellules T — n'affecte pas la présentation des toxines (SEB, SEC) aux lymphocytes T [15]. Ces travaux indiquent que le site de liaison des toxines est localisé à l'extérieur de la niche à peptides. En conformité avec ces résultats, il a été démontré que l'histidine en position 81 de la chaîne  $\beta$  de HLA-DR est essentielle à la liaison de SEA (*figure 2*) [16]. Elle jouerait un rôle dans la formation d'un lien métallique Zn<sup>++</sup> avec des résidus histidine sur les toxines [17]. D'autres résidus voisins de l'histidine 81 sur l'hélice  $\alpha$  de la chaîne  $\beta$  sont aussi associés à la liaison de SEA aux molécules de classe II [18]. Quant à TSST-1, la chaîne  $\alpha$  aurait un rôle prépondérant dans la liaison de cette toxine. En effet, la substitution de la chaîne  $\alpha$  de HLA-DR (qui lie TSST-1 efficacement) par celle correspondante de I-E (qui pos-

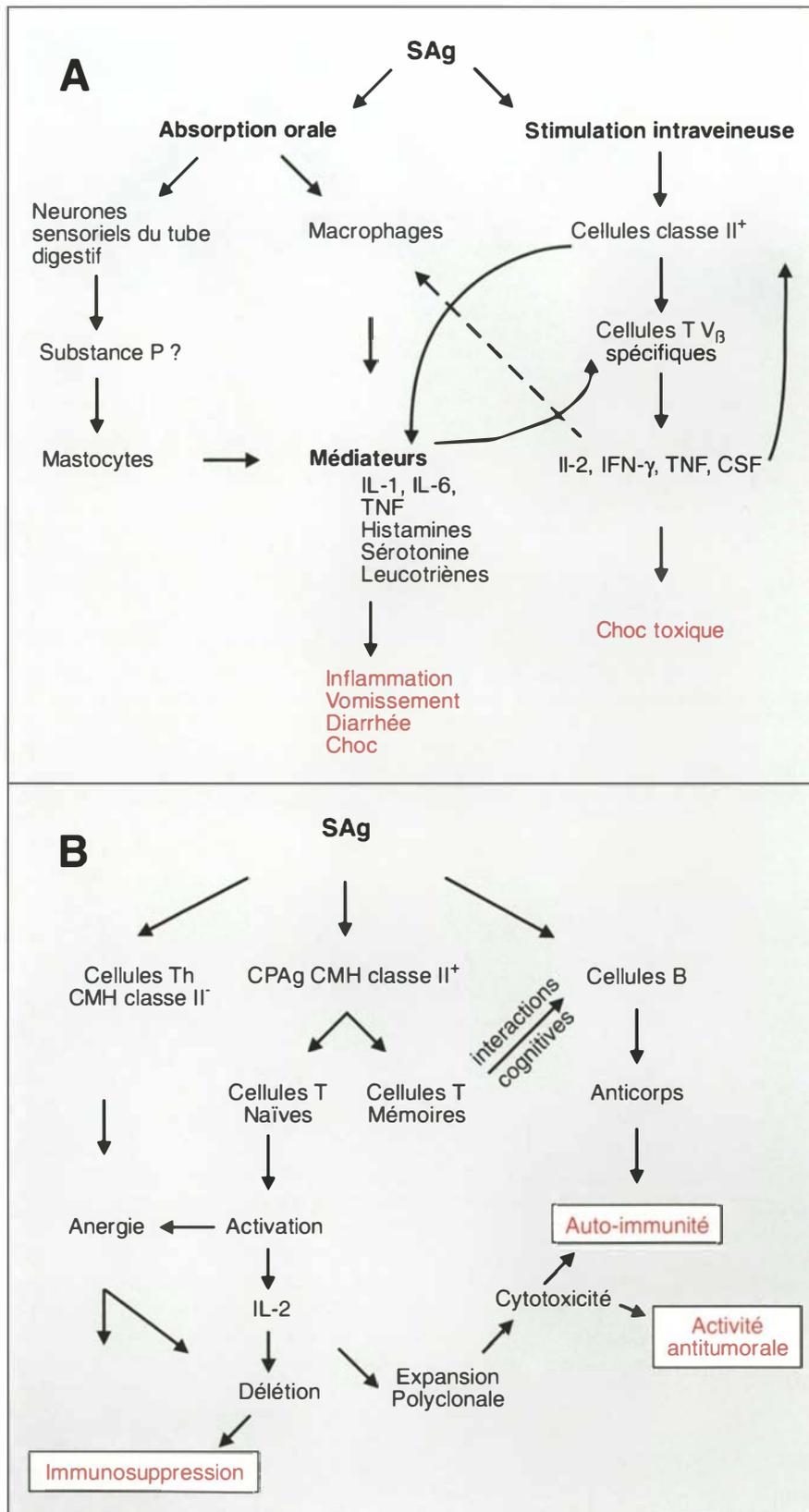


Figure 1. **Propriétés biologiques des superantigènes.** A) Cellules et cytokines participant à la toxicité des entérotoxines. B) Conséquences pathologiques et thérapeutiques possibles à la suite de l'absorption de superantigènes.

m/s n° 5 vol. 9, mai 93

sède une faible affinité pour TSST-1) abolit la liaison de TSST-1 à HLA-DR. L'utilisation de molécules chimériques entre différents allèles de souris ou différents allèles humains laisse penser que TSST-1 interagit avec la région hypervariable 2 de la chaîne  $\alpha$ . Des résultats récents de mutagenèse ont confirmé que les acides aminés critiques pour la fixation de cette toxine, sont localisés sur la chaîne  $\alpha$  et en dehors de la niche à peptide [19]. Cette conclusion n'exclut pas un contact simultané avec la chaîne  $\beta$ . Tout en sachant que certains allèles de classe II ne lient pas les toxines, on ne peut imaginer qu'un individu soit résistant car une cellule exprime plusieurs molécules de classe II différents.

### Interactions avec le R<sub>c</sub>T

Les superantigènes bactériens stimulent les lymphocytes T exprimant des familles distinctes de régions variables de la chaîne  $\beta$  du R<sub>c</sub>T [2, 18, 20]. La spécificité de chacune des toxines de *S. aureus* pour les différentes régions variables du R<sub>c</sub>T est résumée au Tableau I. Les régions variables interagissant avec une toxine donnée, partagent une séquence commune localisée entre les résidus 68 à 74. Des échanges réciproques de cette boucle entre des régions variables de chaîne  $\beta$  ayant des spécificités pour des toxines différentes ont confirmé le rôle que ces acides aminés jouent dans la reconnaissance des superantigènes. Cette boucle, appelée CDR4 (Complementarity Determining Region), présente une grande variabilité de sa séquence d'acides aminés ; elle est située en retrait par rapport aux sections de la chaîne  $\beta$  du R<sub>c</sub>T engagées dans la reconnaissance des peptides antigéniques. Cette constatation confirme que la topologie de l'interaction entre les toxines et les cellules T est différente de la reconnaissance antigénique. Le rôle de la chaîne  $\alpha$  du R<sub>c</sub>T dans la reconnaissance des superantigènes bactériens n'est pas bien établi. Ainsi, des chaînes  $\beta$  solubles du R<sub>c</sub>T peuvent se lier à des complexes classe II-superantigènes bactériens en l'absence de chaîne  $\alpha$  [21]. Par ailleurs, des lymphocytes T exprimant une région V<sub>β</sub> spécifique ne

répondent pas toujours à la toxine laissant supposer ainsi que dans certains cas, la chaîne  $\alpha$  pourrait influencer la formation du complexe trimoléculaire RcT-superantigène-classe II.

Le rôle des différentes molécules de ce complexe est d'ailleurs encore discuté et fait l'objet de plusieurs recherches. La nécessité d'une interaction entre les molécules de classe II et le RcT est encore débattue (figure 3). Deux observations permettent de supposer qu'il n'existe pas d'interaction entre les molécules de classe II et le RcT lors de la présentation des superantigènes. Tout d'abord les toxines sont reconnues par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> qui sont restreints par les molécules classe II, mais aussi par ceux CD8<sup>+</sup> ayant une spécificité antigénique limitée par la présence des molécules classe I du CMH. De plus, les lymphocytes T reconnaissent ces toxines liés à plusieurs allèles des molécules classe II du CMH [7, 8, 22]. D'autres résultats laissent cependant croire que le RcT interagit, non seulement avec la toxine, mais aussi simultanément avec la molécule de classe II. Une analyse plus fine, utilisant une série de lymphocytes T

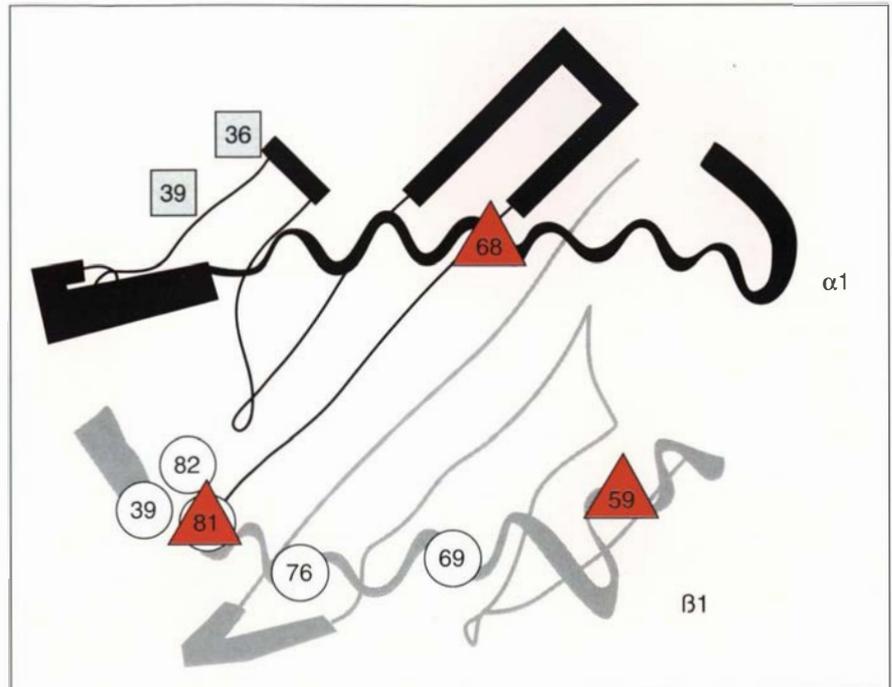


Figure 2. Sites de contact des entérotoxines et du RcT sur les molécules de classe II. Ce schéma représente une vue de haut (ce que verrait le RcT) des domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  de la molécule HLA-DR1. Les cercles et les carrés indiquent les acides aminés ayant un rôle dans l'interaction avec SEA et TSST-1 respectivement. Les triangles indiquent les résidus critiques pour la présentation de SEA et/ou TSST-1 et donc en jeu dans le contact du RcT.

## RÉFÉRENCES

20. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens : mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Ann Rev Immunol* 1991 ; 9 : 745-72.
21. Gascoigne NRJ, Ames KT. Direct binding of secreted T-cell receptor b chain to superantigen associated with class II major histocompatibility complex protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 613-6.
22. Herrmann T, Maryanski JL, Romero P, Fleischer B, MacDonald HR. Activation of MHC class I-restricted CD8 CTL by microbial T cell mitogens. Dependence upon MHC class II expression of the target cells and V usage of the responder T cells. *J Immunol* 1990 ; 144 : 1181-6.
23. Stelma GN, Bergdoll MS. Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical modification. *Biochem Biophys Res Comm* 1982 ; 105 : 121-6.
24. Grossman D, Van M, Mollick JA, Highlander SK, Rich RR. Mutation of the disulphide loop in staphylococcal enterotoxin A. Consequences for T cell recognition. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3274-81.

exprimant des RcT différents, indique que l'efficacité de la réponse varie selon l'allèle utilisé pour la présentation des toxines. De plus, des molécules de classe II mutées sur des résidus mobilisés dans des interactions avec le RcT, ne présentent plus la toxine à certains lymphocytes T malgré une liaison efficace des toxines (Labrecque N., Thibodeau J., Sékaly R.P., manuscrit en préparation) (figure 2). Une telle interaction du RcT avec les molécules du CMH pourrait s'établir par l'intermédiaire de la chaîne  $\alpha$  du RcT.

### Domaines actifs des entérotoxines

Les recherches sur la structure des entérotoxines se sont attardées à identifier les régions responsables 1) des propriétés émétiques, 2) de la liaison aux molécules de classe II et 3) du contact avec le RcT. Les premières expériences ont démontré qu'il était possible de séparer l'activité émétique des entérotoxines de l'activité mitogène

nique [23]. En ce qui concerne les sites de contact des molécules de classe II ou du RcT, les résultats de ces expériences ont démontré que ces régions étaient entremêlées [11]. La structure tridimensionnelle du cristal SEB récemment établie a permis de mieux définir ces 2 différents domaines fonctionnels (figure 4) [5]. Le site d'interaction avec le RcT se présente sous la forme d'une cavité formée par des résidus situés dans les portions N- et C-terminale de SEB. Le site de contact avec la molécule de classe II n'est pas aussi bien défini. Les résidus identifiés lors des études de mutagenèse sont tous situés sur la même face de l'entérotoxine et témoignent de plusieurs points de contact avec les molécules de classe II. Les régions concernées sont cependant adjacentes ; un contact direct et spécifique est probablement possible entre les molécules de classe II et le RcT dans le complexe trimoléculaire. Une autre cavité se trouve sur le côté opposé au site de contact avec les molécules de classe II ; cette observa-

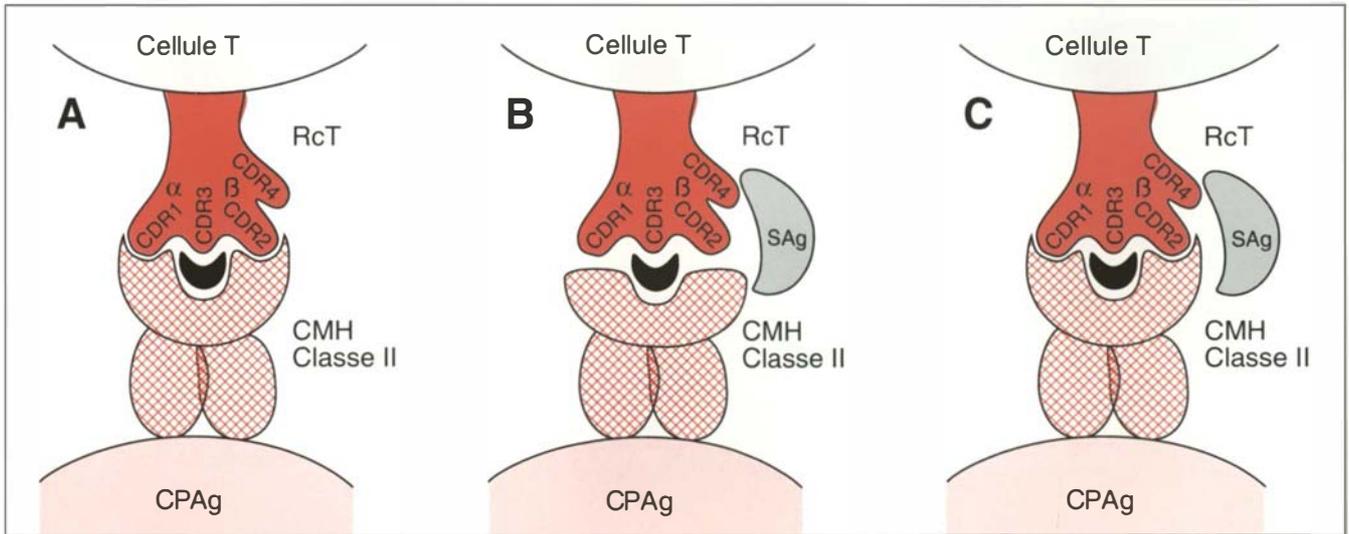


Figure 3. **Modèles de la reconnaissance des superantigènes par les lymphocytes T.** A) Reconnaissance des antigènes conventionnels où le RcT interagit avec les molécules de classe II et le peptide. B) Les superantigènes sont reconnus indépendamment d'une interaction RcT-molécule de classe II. C) Les 3 molécules du complexe et probablement le peptide interagissent les unes avec les autres.



Figure 4. **Représentation schématique de la structure de SEB.** Les sites proposés de contact avec le RcT sont indiqués en rouge alors que les acides aminés entrant en jeu la fixation des molécules de classe II sont situés dans les portions bleues. Le pont disulfure est en jaune. Adapté d'après Swaminathan et al. [5].

## RÉFÉRENCES

25. Friedman SM, Posnett DN, Tumang JR, Cole BC, Crow MK. A potential role for microbial superantigens in the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1991 ; 34 : 468-79.
26. Wucherpfenning KW, Ota K, Endo N, Seidman JG, Rosenzweig A, Weiner HL, Hafler DA. Shared human T cell receptor V $\beta$  usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 1990 ; 248 : 1016-9.
27. Kim C, Siminovitch KA, Ochi A. Reduction of lupus nephritis in MRL/lpr mice by a bacterial superantigen treatment. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 1431-7.
28. Dohlsten M, Hedlund G, Kalland T. Staphylococcal-enterotoxin-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 1991 ; 12 : 147-50.
29. Dohlsten M, Hedlund G, Segren S, Lando PA, Herrmann T, Kelly AP, Kalland T. Class II-negative colon carcinoma cells present staphylococcal superantigens to cytotoxic lymphocytes-T: Evidence for a novel enterotoxin receptor. *Eur J Immunol* 1991 ; 21 : 1229-33.
30. Dohlsten M, Hedlund G, Akerblom E, Lando PA, Kalland T. Monoclonal antibody-targeted superantigens-A different class of anti-tumor agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 9287-91.
31. Rosenberg SA, Lotze MT. Cancer immunotherapy using interleukin-2 and interleukin-2-activated lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 1986 ; 4 : 681-709.
32. Wing MG, Montgomery AMP, Harley C, Lachman PJ. Cytostasis of different tumours by a murine PPD-reactive CD4<sup>+</sup> T lymphocyte clone is mediated by interferon-gamma and tumour necrosis factor alone or synergistically. *Clin Exp Immunol* 1990 ; 82 : 208-13.
33. Rott O, Wekerle H, Fleischer B. Protection from experimental allergic encephalomyelitis by application of a bacterial superantigen. *Inf Immun* 1992 ; 4 : 347-53.
34. Hewitt CRA, Lamb JR, Hayball J, Hill M, Owen MJ, O'Hehir RE. Major histocompatibility complex independent clonal T-cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J Exp Med* 1992 ; 175 : 1493-9.
35. Misfeldt ML. Microbial « Superantigens ». *Inf Immun* 1990 ; 58 : 2409-13.
36. Alber G, Hammer DK, Fleischer B. Relationship between enterotoxic- and T lymphocyte-stimulating activity of Staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol* 1990 ; 144 : 4501-06.

tion amène à considérer qu'une autre molécule pourrait interagir simultanément avec le complexe trimoléculaire. Cette région comprend 3 des 5 histidines de SEB et serait utile dans la reconnaissance d'un autre récepteur, responsable, celui-là, des manifestations entériques par exemple. En effet, il a été démontré que la carboxyméthylation de ces résidus abolit l'activité émétique de SEA et SEB [23, 36].

La boucle, formée par le pont disulfure, est en contact avec le solvant et est située à proximité du site de liaison du récepteur T. La destruction du pont disulfure affecte le pouvoir potentiel mitogénique, sans toutefois affecter la spécificité de l'interaction avec le récepteur T [24]. La spécificité des différents superantigènes pour une V $\beta$  particulière semble imposée par d'autres acides aminés situés en bordure du site d'interaction avec le récepteur T. Confirmant les propriétés inhérentes à la structure cristalline, des expériences récentes ont démontré que la liaison entre SEA et une chaîne V $\beta$ 3 soluble peut être abolie au profit d'une chaîne V $\beta$ 11, en changeant seulement 3 acides aminés dans la région C-terminale de SEA [5].

Les travaux sur la structure du cristal nous aiderons maintenant à orienter la mutagenèse des entérotoxines afin de mieux définir les régions participant à l'interaction avec différents ligands. Soulignons ici que les entérotoxines présentent vraisemblablement une structure tertiaire similaire puisque les résidus variables sont situés dans les tours, dans les boucles ou dans les régions exposées au solvant.

### Entérotoxines et auto-immunité

L'auto-immunité exprime la rupture de la tolérance accordée aux cellules du système immunitaire susceptibles de mobiliser les réactions contre le « soi ». Bien qu'aucune preuve directe ne relie les entérotoxines aux maladies auto-immunitaires, plusieurs faits évidents laissent penser maintenant que des superantigènes sont associés à leur développement [25]. *Mycoplasma arthritidis* représente un excellent modèle pour l'arthrite rhu-

matoïde. Cette bactérie produit un facteur mitogénique soluble (MAM) dont les propriétés superantigéniques seraient reliées au développement de la maladie chez le rat. Dans d'autres maladies auto-immunitaires comme, par exemple, la sclérose en plaques chez l'humain et le lupus néphrotique chez la souris, on trouve chez les individus souffrant de ces maladies une augmentation de cellules T exprimant une V $\beta$  donnée [26, 27]. Cette prédominance V $\beta$  n'est pas toujours observée, elle peut varier selon le stade de la maladie ; cependant, ce phénomène rappelle l'action des superantigènes sur le répertoire des cellules T. A la suite d'une infection, les superantigènes provoqueraient la maladie d'au moins trois façons. Premièrement, une auto-immunité spécifique d'organe pourrait résulter de l'activation de cellules Tc ou Th auto-réactives épargnées par l'inactivation. Le transfert de la maladie EAE par l'injection de cellules CD4<sup>+</sup> confirme l'importance de ces cellules. La lyse des cellules classe II<sup>+</sup> provoquée par les lymphocytes T ainsi activés (SDCC) affaiblirait le système immunitaire et laisserait la bactérie en tirer avantage [28]. Une deuxième possibilité serait que le superantigène se lie aux molécules de classe II sur les cellules B ; il permettrait ainsi une interaction cognitive avec les cellules T arborant le segment V $\beta$  complémentaire. Des interactions de ce genre, menant à l'activation des cellules B et à la production d'anticorps, ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo* en utilisant le superantigène MAM [25]. Troisièmement, l'activation partielle des cellules B par les superantigènes circulants suffirait à établir un bassin de cellules B mémoires qui, en présence d'un antigène ou de lymphokines, produiraient des anticorps dont certains seraient spécifiques du soi.

### Potentiel thérapeutique

L'utilisation des entérotoxines comme agents antitumoraux est actuellement envisagée. Plusieurs équipes ont déjà démontré *in vitro* la capacité de certaines entérotoxines de provoquer la lyse de cellules cancéreuses par des

lymphocytes T cytotoxiques. On a obtenu une réduction significative de l'apparition de tumeurs à la suite d'un traitement avec SEB chez des souris C3H inoculées avec la lignée tumorale 1691-PRO4L provoquant des cancers de la peau [29]. L'injection de cette toxine entraîne l'augmentation de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> Vβ8<sup>+</sup> exprimant le récepteur de l'IL-2 ; ces derniers seraient directement responsables de la régression des tumeurs. Mais comme l'injection de toxines *in vivo* pourrait avoir des effets désastreux sur l'organisme, il faut qu'elles soient bien concentrées dans le site même de la tumeur ; c'est pourquoi les toxines pourraient être couplées chimiquement à des anticorps spécifiques des cellules transformées. De telles molécules (conjuguées anticorps-SEA) se sont avérées capables, par des lymphocytes T cytotoxiques, de produire la lyse de cellules classe II<sup>-</sup> de carcinome du colon [30]. Ce résultat est surprenant puisque en général la présentation de toxines en l'absence de molécules de classe II aboutit à une paralysie fonctionnelle des lymphocytes T. L'oligomérisation de complexes anticorps-toxines (« capping ») produirait dans ce modèle l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Plusieurs protocoles thérapeutiques consistant en une injection systémique de fortes concentrations d'IL-2 sont en cours ; malgré des débuts prometteurs, cette forme d'immunothérapie est en général mal tolérée par l'organisme [31]. L'injection de complexes anticorps-toxines éviterait ce problème. Ces complexes s'achemineraient directement au site de la tumeur et induiraient la production localisée d'IL-2. Celle-ci aurait pour effet de restaurer l'activité fonctionnelle des lymphocytes T qui s'infiltreraient dans la tumeur et qui sont, en général, anergiques. D'autres cytokines, comme l'interféron-γ et la cachectine (TNFα et β), qui sont généralement sécrétées à la suite de l'activation des lymphocytes T par les toxines, pourraient faciliter la régression des tumeurs. La cachectine lyserait directement les cellules tumorales alors que l'interféron-γ entraînerait la libération des molécules de classe II à leur surface. Cette libération aurait pour effet de recruter des lymphocytes

T CD4<sup>+</sup> (Tc ou Th) exclusifs à la cellule tumorale, augmentant ainsi la réponse cellulaire [32]. Il est probable que ces toxines se fixeraient sur toutes les cellules exprimant des molécules de classe II, ce qui aurait pour effet de les empêcher de se rendre dans le site de la tumeur. La liaison de ces conjugués avec lymphocytes T en l'absence de certains co-sigaux spécifiques émis par des cellules spécialisées entraînerait l'anergie ou l'apoptose des lymphocytes T. Le site de liaison des entérotoxines avec des molécules de classe II devrait donc être préalablement éliminé par manipulations génétiques.

Les modèles de maladies auto-immunitaires indiquent que des lymphocytes T, portant des RcT ayant un segment Vβ particulier, joueraient un rôle dans le développement de ces maladies. L'utilisation des entérotoxines pour éliminer ces lymphocytes, par apoptose ou par anergie, a déjà été proposée. C'est ainsi qu'une réduction de lupus néphrotique a été observée chez la souris après un traitement avec des superantigènes bactériens [27]. D'autre part, des rats Lewis n'ont pas été atteints d'une encéphalomyélite allergique expérimentale à la suite de l'injection de SEE [33]. L'anergie serait donc provoquée par le contact du RcT avec le superantigène soluble, c'est-à-dire non lié aux molécules de classe II (figure 1) [34]. L'utilisation à nouveau d'entérotoxines mutées dans le site de liaison de molécules de classe II éviterait la production indésirable de lymphokines et d'anticorps.

### Conclusion

Les expériences effectuées sur les entérotoxines de *S. aureus* constituent de bon moyens d'étudier les composantes structurales menant à l'activation des lymphocytes T. La compréhension de leur topologie rendra possible la mise au point de superantigènes spécifiques de chacune des molécules de classe II ou de chacun des récepteurs T. L'utilisation de molécules ne pouvant interagir avec le RcT nous aidera à concurrencer la fixation de toxines néfastes sur les molécules de classe II et ainsi à moduler la réponse immunitaire. Ces

toxines synthétiques pourraient aussi empêcher le contact entre des cellules présentant des peptides antigéniques du soi et des lymphocytes T auto-réactifs. En effet plusieurs allèles des molécules de classe II sont reliés aux maladies auto-immunitaires ; on pourrait les rendre inefficaces sans même connaître la nature du peptide présenté. La découverte de superantigènes viraux comme ceux encodés par MMTV (*mouse mammary tumor virus*), dont la séquence primaire est très différente de leurs homologues bactériens, va permettre une analyse menant à des règles structurales dans le développement de superantigènes pharmacologiques [20]. Cependant le traitement de diverses pathologies grâce aux superantigènes demeure une perspective théorique. Plusieurs années de recherches seront nécessaires, aussi bien sur les superantigènes que sur les maladies auto-immunitaires, avant d'espérer sérieusement les utiliser à des fins thérapeutiques ■

### Remerciements

J.T., N.L. et R.P.S. sont subventionnés par le Conseil de la Recherche Médicale du Canada. Les auteurs remercient V.V. Micusan pour plusieurs discussions stimulantes et François Denis pour son aide lors de l'analyse informatique.

### Summary

#### Bacterial superantigens : pathogenic agents or therapeutic tools

*Staphylococcus aureus* enterotoxins are one of the major cause of food poisoning in man and these molecules are superantigens. They greatly affect the immune system and might be responsible for the development of autoimmune diseases. These toxins however could be used as therapeutics in many pathologies.

### TIRÉS A PART

Rafick-Pierre Sékaly.