

Médecine expérimentale

M. Alain FISCHER, professeur

ENSEIGNEMENT

Leçon inaugurale

Il s'agit du premier rapport d'activité de la chaire de Médecine expérimentale, que j'occupe depuis le 1^{er} janvier 2014. L'objectif de la chaire est d'explorer comment deux disciplines biologiques, la génétique et l'immunologie, viennent éclairer les pathologies majeures que sont la susceptibilité aux infections, les maladies auto-immunes et inflammatoires, les maladies allergiques et certaines formes de cancer. Plus particulièrement, l'étude des pathologies rares monogéniques (d'hérédité mendélienne) contribue à l'identification des composants moléculaires essentiels des défenses immunitaires, à l'appréciation de l'agencement des mécanismes de défense mis en jeu lors de certaines infections ainsi que des mécanismes de protection contre les maladies auto-immunes. Au delà du progrès de ces connaissances, nous nous attachons à les utiliser pour développer de nouvelles thérapeutiques des formes les plus sévères de ces maladies rares dénommées déficits immunitaires héréditaires (DIH). En particulier, nous cherchons à mettre au point une thérapeutique par correction génique (thérapie génique) de certaines de ces maladies. Lors de la leçon inaugurale (15 mai 2014), j'ai cherché à mettre en perspective ces travaux et j'ai montré comment ils s'inscrivent dans l'évolution de la recherche médicale^a. Ils ont ainsi profité par exemple de l'irruption, à partir des années 70, des concepts et outils de la biologie moléculaire dans le traitement des questions médicales.

Une approche scientifique réductionniste – une question, une molécule, une voie biologique – a été et est encore extrêmement fructueuse dans l'avancée de la compréhension de mécanismes de maladies et parfois dans la mise au point de

a. Le texte de la leçon inaugurale est disponible sous forme imprimée (Collège de France/ Fayard, 2014) et numérique (<http://books.openedition.org/cdf/3701>). Pour les versions audio et vidéo, voir le site Internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-fischer/index.htm#inaugural-lecture> [NdÉ].

traitements. Toutefois, la complexité du vivant rend cette approche insuffisante dans bien des cas. Les nouvelles possibilités d'analyse à grande échelle des composants du vivant, des variations des séquences du génome d'un individu à l'autre, des profils d'expression des gènes (ARN messenger), des protéines, etc. ouvrent des perspectives d'analyse détaillée de situations complexes dont la médecine devra relever le défi.

Cours : Éléments d'analyse du système immunitaire

Ce cours comporte six thèmes dont cinq ont également fait l'objet de séminaires donnés par des experts de chacun de ces domaines^b. L'objectif était de situer puis d'aborder un certain nombre de questions actuelles qui font l'objet d'études fondamentales en immunologie. Mon souhait est que cet enseignement serve de base pour les cours des prochaines années où seront discutés la physiopathologie de désordres du système immunitaire : maladies auto-immunes et inflammatoires d'une part, thérapeutiques immunologiques d'autre part.

Cours 1 : Comment, (pourquoi) étudier le système immunitaire

Le premier cours a comporté une introduction rappelant quels sont les principaux mécanismes effecteurs de l'immunité innée (barrière physique passive et active, réponses sécrétoires et cellulaires) et de l'immunité adaptative (fonction des lymphocytes T et B). Nous avons évoqué ensuite les questions fondamentales et médicales qui « justifient » le fait de chercher à caractériser « l'état de santé » du système immunitaire d'un être vivant ou d'une population. Les différentes approches d'analyse ont été présentées en indiquant les progrès technologiques décisifs survenus au cours de ces dernières années : depuis l'analyse phénotypique par cytométrie en flux des années 1980 et les possibilités d'analyse multiparamétriques offertes par l'utilisation de la déconvolution spectrale des rayonnements de fluorescence émis par des fluorochromes couplés à des anticorps monoclonaux, jusqu'à l'analyse par spectrométrie de masse de métaux lourds couplés à des anticorps fixés aux cellules d'intérêt. L'utilisation de la microscopie biphotonique permet aujourd'hui de visualiser *in vivo* chez l'animal le comportement de cellules du système immunitaire, par exemple au cours de leur activation dans un organe lymphoïde secondaire. Il est désormais possible de combiner cette visualisation dynamique avec une imagerie fonctionnelle qui objective des événements d'activation ou de réponse biologique telle que la cytotoxicité ou la production de cytokines. Une troisième ligne de recherche concerne l'étude du profil d'expression des gènes par type cellulaire particulier, en fonction d'une stimulation donnée. Couplé à l'analyse du polymorphisme de variants du génome au sein d'une population donnée, il devient ainsi possible de mettre en évidence des corrélations en « cis » et en « trans » entre séquences génétiques données et le degré d'expression génique. Ces travaux pourront permettre d'identifier des voies moléculaires clés, en jeu lors de réponses à des microorganismes, ainsi que leur variabilité génétique (susceptible d'expliquer la

b. Cours et séminaires sont disponibles en audio et en vidéo sur le site Internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-fischer/course-2013-2014.htm> et <http://www.college-de-france.fr/site/alain-fischer/seminar-2013-2014.htm> [NdÉ].

vulnérabilité/résistance à certaines infections et corrélée à des facteurs de risque de réponses pathologiques auto-immunes ou inflammatoires). Les analyses de ces données à grande échelle, combinées à la détermination qualitative et quantitative des microbes (bactéries, virus...) présents au niveau de la peau, des muqueuses ou du sang, commencent ainsi à contribuer à déterminer « l'état de santé » du système immunitaire.

Cours 2 : La mémoire immunitaire

Un des principes de l'immunité adaptative consiste, au décours d'une réponse immunitaire déclenchée par un agent infectieux, en une génération de lymphocytes T et B « mémoires » c'est à dire à longue durée de vie et capables lors d'une nouvelle infection par le même agent microbien (ou un agent proche) de générer une réponse plus rapide et plus efficace neutralisant l'agent infectieux avant que celui-ci ne provoque une maladie. C'est le principe sur lequel repose la vaccination, réussite la plus probante de l'immunologie.

Les lymphocytes T mémoires peuvent être identifiés à l'aide de marqueurs membranaires, ce qui en facilite grandement l'analyse. Ainsi nombre et caractéristiques de ces cellules peuvent être déterminés. On a récemment mis en évidence qu'il existait une population de lymphocytes T mémoires dotées de caractéristiques de cellules souches, donc capables d'auto-renouvellement, ce qui rend compte du caractère durable de cette mémoire. Une propriété importante des lymphocytes T mémoires consiste dans le fait que le profil de leur métabolisme est distinct de celui des lymphocytes T naïfs. Il est marqué par la présence d'un équipement énergétique mitochondrial plus élevé qui permet à ces cellules de rapidement mettre en jeu des sources d'énergie nécessaires à leur activation et à leur division lors d'une stimulation. Des études expérimentales *in vivo* fondées sur l'injection d'une seule cellule ont permis de montrer la diversité fonctionnelle des lymphocytes T générés et d'analyser les modalités de cette hétérogénéité. Une notion essentielle acquise au cours de ces dernières années concerne la détection de lymphocytes T mémoires au sein des tissus, à proximité de lieux possibles d'infection : peau, intestin, poumons... Cette compartimentalisation favorise une adaptation des réponses aux microorganismes présents dans tel ou tel territoire (tel que l'herpès simplex au niveau de la peau, le rotavirus dans l'intestin...). Cette observation conduit à proposer un concept d'« immunité régionale » fondée sur des niches anatomiquement définies.

La persistance de lymphocytes T et B mémoires sur des dizaines d'années a aujourd'hui été démontrée, malgré une relative perte cellulaire liée aux phénomènes de senescence et d'exhaustion clonale. L'ensemble des travaux mentionnés ici contribue à l'amélioration des stratégies vaccinales fondées sur le ciblage de niches cellulaires et la précocité des vaccinations.

Ce cours a été suivi d'un séminaire intitulé « Mémoire des lymphocytes B » donné par le Pr Jean-Claude Weill de l'université Paris Descartes, spécialiste de la biologie des lymphocytes B. Il a en particulier évoqué les rôles respectifs des plasmocytes à longue durée de vie et des lymphocytes B mémoires dans la persistance et la sélection de la production d'anticorps de haute affinité.

Cours 3 : Détermination des réponses effectrices des lymphocytes T

Les lymphocytes T sont activés par la reconnaissance de peptides antigéniques associés aux molécules d'histocompatibilité présents à la surface des cellules présentant l'antigène : les cellules dendritiques. En fonction du contexte de cette présentation et de la mise en jeu de récepteurs pour les molécules d'origine microbienne de l'immunité innée présents dans les cellules dendritiques, est déterminé le type de réponse des lymphocytes T (TH₁, TH₂, TH₁₇...) adapté. La biologie des cellules dendritiques, dans leur rôle d'intégrateur de signaux, a beaucoup progressé ces dernières années. La spécialisation de ces cellules, leur origine et leurs modalités de différenciation ont été en grande partie précisées ainsi que leurs nombreuses fonctions. La présence de cellules dendritiques spécialisées au sein des tissus rend compte de l'induction de réponses immunes adaptées à chaque environnement. Les signaux transmis aux lymphocytes T permettent la mise en place de programme de différenciation de cellules effectrices spécialisées impliquées dans des mécanismes précis d'immunité anti-infectieuse. Les principaux facteurs de transcription qui gouvernent ces programmes ont été identifiés. Néanmoins, une certaine plasticité des lymphocytes T effecteurs a été observée, certains étant dotés de capacités effectrices multiples ou évolutives. Les analyses en cours de la régulation transcriptionnelle des *loci* génétiques clés de ces programmes devrait éclairer les mécanismes épigénétiques en jeu dans cette modulation fine à l'échelle unicellulaire des caractéristiques des réponses immunes adaptatives.

Le cours a été suivi d'un séminaire intitulé « Cellules dendritiques et réponses immunitaires » donné par le Dr Sébastien Amigorena, chercheur à l'Institut Curie et un des grands experts de la biologie de ces cellules. S. Amigorena a particulièrement contribué à l'étude des mécanismes de la « présentation croisée » qui permet aux cellules dendritiques de présenter des antigènes d'origine exogène aux lymphocytes T CD8. Ce mécanisme de présentation antigène contribue de façon décisive à l'immunité anti-infection et anti-tumorale.

Cours 4 : Activation lymphocytaire

Dans ce cours ont été présentés les aspects quantitatifs et qualitatifs de la reconnaissance d'un antigène peptidique par le récepteur T pour l'antigène. On a fait état de travaux récents qui montrent qu'un seul complexe peptide-molécule d'histocompatibilité (CMH) est nécessaire et suffisant pour induire l'activation d'un lymphocyte T CD4. Le caractère digital de la réponse (+ ou -) a été démontré. Le rôle des constants d'association (détachement du récepteur pour le complexe ag/MHC) et du temps d'interaction (qui est interrompu et cumulatif) ont été mis en avant. Ces résultats conduisent à proposer un modèle d'activation qui associe une série d'événements membranaires, dont le regroupement en *clusters* des récepteurs pour l'antigène. De nombreuses molécules de co-stimulation dont les ligands sont présents à la surface des cellules dendritiques amplifient et modulent les voies de signalisation inductrices des fonctions effectrices des lymphocytes T. De nombreuses voies de signalisation intracellulaires sont ainsi mises en jeu, et les modalités d'intégration des signaux, leur dynamique et leur localisation à la synapse entre cellules présentant l'antigène et les lymphocytes T font l'objet de nombreux travaux. Néanmoins, on a décrit une compartimentalisation anatomique et dynamique de cette synapse qui rend compte de l'activation cellulaire.

Une des conséquences importante de l'activation lymphocytaire consiste en l'adaptation rapide du métabolisme lymphocytaire qui permet à ces cellules d'augmenter de volume, de se diviser rapidement (toutes les 6 à 8 heures), ce qui implique une synthèse active de membranes, donc de phospholipides, mais aussi de protéines et d'acides nucléiques (ARN et ADN). Ces adaptations sont contrôlées par deux protéines clés, cMyc et mTORC, qui induisent les modifications métaboliques *ad hoc* (utilisation notamment du glucose et de la glutamine comme source d'énergie). On peut ainsi définir aujourd'hui le « profil métabolique » des différentes entités de lymphocytes T effecteurs, régulateurs ou mémoires, qui rendent compte de leur capacité de réponse.

Le cours a été suivi d'un séminaire intitulé « Vers une biologie intégrative des lymphocytes T » donné par Bernard Malissen, chercheur au Centre d'immunologie de Marseille Luminy. B. Malissen a décrit une approche novatrice d'analyse raffinée des multiples interactions protéine-protéine mise en jeu dans l'activation des lymphocytes T fondées sur la construction de lignées de souris transgéniques dont chaque protéine clé de l'activation est liée à une « marque » qui permet d'isoler les protéines avec lesquelles chacune d'entre elles interagit. Cette approche globale – systémique – permet de percevoir la complexité des voies de signalisation mises en jeu et d'envisager une approche quantitative de ces phénomènes.

Cours 5 : Différenciation des cellules du système immunitaire

Les cellules du système immunitaire (lymphocytes, cellules dendritiques, cellules phagocytaires) proviennent du système hématopoïétique qui, à l'âge adulte, est situé dans la moelle osseuse.

Les lymphocytes T se différencient dans le thymus au cours d'une série d'étapes impliquant migration cellulaire, division, différenciation/spécification, sélection et migration des cellules matures vers les organes lymphoïdes secondaires. L'organe thymique est généré à partir de cellules souches épithéliales situées dans l'endoderme pharyngé. Les gènes clés de ce programme ont été identifiés. Les progéniteurs, selon un programme moléculaire non encore élucidé, donnent naissance aux cellules épithéliales du cortex et de la médulla. La différenciation du thymus implique un *cross talk* entre précurseurs lymphocytaires, cellules dendritiques et cellules épithéliales. La connaissance fine de ces communications intercellulaires est un défi important dont un but pourrait être la capacité d'amplifier ou de régénérer les fonctions thymiques. Cependant, le thymus est doté d'une horloge temporelle qui conduit à son involution, phénomène dont nous ne connaissons pas à ce jour les mécanismes moléculaires mais dont on peut penser qu'il fut sélectionné lors de l'évolution comme sécurité contre des risques excessifs de leucémogénèse lymphocytaire et/ou d'auto-immunité. Les facteurs clés inducteurs de la spécification des précurseurs des lymphocytes T et B et leur agencement hiérarchique sont aujourd'hui connus ; leur action est progressive au cours de la lymphopoïèse thymique (lymphocytes T) ou médullaire (lymphocytes B). Les événements de sélection de faible affinité dite « positive » (par reconnaissance de peptides du soi à faible affinité) puis « négative » (par reconnaissance de peptides du soi à forte affinité) ont retenu l'attention des immunologistes depuis de nombreuses années. Ils ont notamment conduit à identifier le rôle de la protéine AIRE dans l'induction « ectopique » d'expression de protéines tissulaires au sein des cellules de la médulla. Cela permet de présenter aux lymphocytes T une large gamme de peptides du soi. La production des lymphocytes T nécessite chez l'homme plus de trois mois, un

temps long dont les étapes – telles qu’elles peuvent être analysées chez la souris par microscopie vitale fonctionnelle – ne sont encore que bien imparfaitement connues. Il s’agit d’une question essentielle dont l’enjeu pourrait être de réduire les risques inhérents à l’absence de production de lymphocytes T chez l’homme pendant une phase longue après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Le cours a été suivi d’un séminaire intitulé « *Design principles of adaptive immune system* » donné par Thomas Boehm, directeur de l’Institut Max Planck d’immunologie et d’épigénétique de Freiburg, un chercheur qui a identifié les étapes initiales de l’organogenèse thymique. Il a en particulier montré comment, au cours de l’évolution, des organes « thymoïdes » se sont développés selon un programme identique, à celui du thymus en association avec un système d’immunité adaptative particulier telle qu’observable chez la lamproie.

Cours 6 : Les effecteurs de l’immunité innée

La quasi-totalité du monde eucaryote partage un même système de défense immunitaire : l’immunité innée, fondée sur l’identification des profils moléculaires propres au monde microbien et non présents chez l’hôte. Toutes les cellules possèdent un tel programme où des récepteurs, qui assurent une veille permanente, sont situés à la surface cellulaire, dans le cytoplasme ou encore dans des compartiments endosomaux. Leur mise en jeu induit un système de transmission de signaux, dont le nombre est restreint, lequel à son tour induit rapidement (en quelques heures) l’activation transcriptionnelle de gènes codants pour une série de protéines à action anti-infectieuse directe ou indirecte, telle que l’interleukine 1 ou les interférons. Le principe de ce système est remarquablement conservé de *C. elegans*, *Drosophila*, à l’homme. Il s’est diversifié au cours de l’évolution. Les mammifères disposent de cinq classes de récepteurs. Les aspects moléculaires de cette reconnaissance, ainsi que de la signalisation, ont été identifiés en quelques années. En parallèle, la génétique humaine médicale (effets de mutations) et la génétique évolutionniste pointent vers le caractère non redondant de certains de ces récepteurs et identifient des fonctions essentielles de l’immunité anti-bactérienne, fongique ou virale.

Dans une certaine mesure, le « prix à payer » de l’ajustement au cours de l’évolution de l’immunité innée aux microorganismes hôtes de l’homme – une meilleure résistance – est un risque accru de maladies inflammatoires ou auto-immunes, lié à une réponse d’intensité plus forte.

À des profils moléculaires microbiens reconnus, les récepteurs peuvent en effet reconnaître des produits issus de cellules soumises à un stress, augmentant alors la réactivité des réponses de l’immunité innée aux agressions externes. Les modalités de mise en jeu de l’immunité innée (les types de récepteurs et d’effecteurs) dictent le profil de réponse de l’immunité adaptative induite secondairement. L’intégration de ces signaux s’effectue essentiellement au niveau des cellules présentatrices d’antigène – les cellules dendritiques – comme cela fut évoqué dans un cours antérieur. L’immunité innée comprend ainsi des cellules spécialisées dans la phagocytose et la microbicidie, cellules recrutées par les premiers signaux émis, ainsi que des lymphocytes dont l’importance a été très récemment reconnue : les *cellules lymphocytaires innées*.

Le cours fut suivi d’un séminaire intitulé « Les cellules “*Natural Killer*” (NK) lymphocytaires innées et l’immunité » donné par Éric Vivier, directeur du Centre d’immunologie de Marseille Luminy. Éric Vivier est un éminent spécialiste des

lymphocytes NK. Le séminaire a porté sur les connaissances acquises par son groupe de recherche sur l'éducation des cellules NK, leur importance dans l'immunité anti-infectieuse et tumorale, puis É. Vivier a décrit la théorie qu'il a récemment élaborée, laquelle postule un rôle de la discontinuité de stimulation du système immunitaire dans la mise en jeu de ce dernier.

RECHERCHE

Anomalies héréditaires du système immunitaire

Nous poursuivons la caractérisation d'anomalies génétiques du système immunitaire avec le double objectif de contribuer à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans les réponses immunitaires, notamment adaptatives, et d'améliorer la prise en charge médicale des pathologies concernées.

L'étude de huit patients souffrant d'infections virales et bactériennes sévères au cours des premières années de vie, et dont les lymphocytes T et B ont une capacité de division réduite lors d'une activation *in vitro* par des antigènes, a conduit à identifier des mutations bialléliques du gène «CTPS1», qui code pour la cytidine triphosphate synthétase 1, une enzyme nécessaire à la synthèse *de novo* des bases pyrimidiques. Ces dernières sont indispensables à la synthèse des acides nucléiques ADN et ARN ainsi qu'à la synthèse de phospholipides. Ce déficit met en évidence le recours à la synthèse *de novo* des pyrimidines pour que soient possibles les étapes de division cellulaire très actives des lymphocytes T et B lors de l'activation pour un antigène. Une telle activation induit en quelques heures une forte expression de l'ARNm codant pour CTPS1, puis de la protéine elle-même. Cette activation transcriptionnelle dépend des kinases erk et de la famille src. La voie moléculaire précise de cette induction reste à déterminer. Le fait que le déficit en CTPS1 n'affecte que la division des lymphocytes lors de l'activation antigénique indique que les étapes de prolifération des précurseurs des lymphocytes qui sont préservés ne dépendent que peu ou pas de la synthèse *de novo* des pyrimidines. De même, bien que CTPS1 soit exprimée de façon ubiquitaire, le déficit de cet enzyme n'a aucune conséquence sur la fonction (division) d'autres tissus. Ainsi, cette pathologie met en évidence un nouveau mécanisme d'induction d'un déficit immunitaire; surtout, elle conduit à postuler qu'un médicament inhibant spécifiquement CTPS1 constituerait un agent immunosuppresseur sélectif, peu toxique, de grand intérêt pour le traitement de maladies auto-immunes ou la prévention des phénomènes de rejet de greffes d'organes, ou encore de réaction du greffon contre l'hôte après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Des efforts sont entrepris dans ce sens, en s'appuyant en particulier sur des modèles murins *ad hoc*.

Nous avons mis en évidence deux pathologies héréditaires responsables de la survenue précoce de colites inflammatoires, modèles rares d'une pathologie relativement commune: la maladie de Crohn. Il s'agit des déficits en XIAP et en TTC7A. La molécule XIAP a des fonctions anti-apoptotiques, mais aussi d'ubiquitination, en particulier dans les événements de signalisation induits par l'activation du récepteur de la famille NLR de l'immunité innée NOD2. De fait, les monocytes des patients déficients en XIAP ne sont pas capables de produire des chemokines MCP1 ou IL8 après stimulation par le muramyl dipeptide, un ligand bactérien de NOD2. Ces résultats confortent l'idée d'un rôle de l'activation de NOD2 par les bactéries commensales de l'intestin comme mesure de protection de

la barrière intestinale. Il est par ailleurs possible que XIAP exerce d'autres fonctions, indépendantes de NOD2, dont la perte favorise la survenue de colites inflammatoires. Les travaux sur ces questions se poursuivent dans un modèle expérimental de colites chez la souris XIAP déficiente.

La protéine TTC7A fait partie de la famille des protéines à domaine « TPR » impliquées dans de nombreuses interactions protéine-protéine. Le déficit complet en TTC7A provoque l'association d'un déficit immunitaire profond de toutes les populations lymphocytaires avec de multiples atrésies de l'intestin, qui témoignent d'un rôle majeur de TTC7A dans le développement intestinal. L'étude *in vitro* de la différenciation de cellules souches de l'intestin issues de biopsie de patients montre un défaut profond de différenciation, défaut corrigé par l'adjonction d'une molécule inhibitrice de la Rho kinase (ROCK). Ce résultat spectaculaire indique qu'en l'absence de TTC7A, la Rho kinase est hyperactive et provoque une anomalie de l'association du cytosquelette d'actine à la membrane cellulaire. Il en résulte un défaut de polarisation apicobasale des cellules entérocytaires et un défaut d'organisation de la muqueuse intestinale. TTC7A régule également l'organisation du cytosquelette dans les cellules hématopoïétiques. Reste à identifier les voies moléculaires par lesquelles TTC7A régule la Rho kinase. La réversibilité *in vitro* des conséquences de cette pathologie offre des perspectives thérapeutiques intéressantes, en particulier dans une forme « atténuée » de cette pathologie liée à la survenue de mutations hypomorphiques du gène TTC7A.

Nous avons montré que deux pathologies héréditaires du système immunitaire, le syndrome d'activation de la phosphoinositide-3 kinase δ et le déficit de la voie IL10 (défaut en IL10 récepteur) induisaient un risque de survenue de lymphomes dont nous avons caractérisé (dans le second cas) la signature moléculaire précise.

Enfin, nous avons mis en évidence que l'accumulation de lymphocytes T CD4(-) CD8(-) au cours de la pathologie dénommée « syndrome lymphoprolifératif auto-immun » (ALPS), liée à un défaut de mort cellulaire provoquée par des anomalies du récepteur de mort FAS, désorganise l'anatomie de zones fonctionnelles importantes de la rate. Il s'agit de la zone marginale où sont normalement regroupés les lymphocytes B capables de produire des anticorps d'isotype IgM, indépendamment d'une coopération avec les lymphocytes T. Il en résulte un défaut de production d'anticorps d'isotype IgM dirigé contre des polysaccharides bactériens et une vulnérabilité aux infections systémiques par *streptocoque pneumoniae*. Cette observation a été confirmée dans un modèle murin d'ALPS. Il s'agit là d'un mécanisme original de déficit immunitaire par désorganisation de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires à l'accumulation de lymphocytes T capables d'interagir avec les cellules stromales de ces structures et d'être ainsi en compétition avec les cellules « normales ». Cette observation conduit à une approche thérapeutique de l'ALPS adaptée.

Développement de la thérapie génique de déficits immunitaires héréditaires

Nous avons poursuivi en 2014 les essais thérapeutiques de correction de deux déficiences héréditaires sévères du système immunitaire : le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (DICS lié à l'X) et le syndrome de Wiskott Aldrich (WAS). La stratégie employée consiste en l'injection *ex vivo* de progéniteurs hématopoïétiques obtenus à partir de la moelle osseuse, à l'aide de rétrovirus modifiés comportant une copie fonctionnelle du gène muté (γ_c dans la DICS lié à l'X et WASP dans le WAS). Dans le premier cas, un gamma rétrovirus est utilisé,

et dans le second, un lentivirus (HIV). Ces virus ont été modifiés de telle façon qu'ils ne disposent pas d'éléments *enhancer* capables d'induire la transactivation d'un gène propre à la cellule après intégration. En effet, ces virus ont la propriété d'induire l'intégration de leur matériel génétique au sein du génome des cellules infectées. Il en résulte que le gène « thérapeutique » ainsi intégré est répliqué à chaque division cellulaire. L'expression du gène thérapeutique est induite par l'adjonction d'un promoteur dans le vecteur (facteur d'élongation 1α dans le cas de γ , promoteur endogène de WASP dans le second).

Les essais cliniques en cours réalisés dans le cadre d'une collaboration internationale (équipes de Boston et de Londres, Genethon pour la production du vecteur WASP) apportent des résultats très encourageants, à la fois en termes de sécurité d'emploi (absence d'effets génotoxiques) et en terme d'efficacité (correction du déficit immunitaire). Ils demandent cependant à être confirmés par un plus long recul d'observation (trois ans et demi maximum à ce jour avec ce type de vecteur) et le traitement d'un plus grand nombre de malades (9 et 6 respectivement à ce jour). Des travaux précliniques sont en cours pour le développement de thérapie génique d'autres formes de déficits immunitaires héréditaires : le DICS par déficit en protéine Artemis, la granulomatose septique liée à l'X et la lymphohistiocytose familiale de type 3. Des premiers essais cliniques devraient être initiés d'ici un à deux ans. De plus, une réflexion est en cours sur l'utilisation d'une méthode alternative de thérapie génique consistant non plus en l'addition d'une copie fonctionnelle du gène mais en la correction de la mutation par recombinaison homologue.

PUBLICATIONS

AGUILAR C., LENOIR C., LAMBERT N., BÈGUE B., BROUSSE N., CANIONI D., BERREBI D., ROY M., GÉRART S., CHAPEL H., SCHWERD T., SIPROUDHIS L., SCHÄPPI M., AL-AHMARI A., MORI M., YAMAIDE A., GALICIER L., NEVEN B., ROUTES J., UHLIG H.H., KOLETZKO S., PATEL S., KANEGANE H., PICARD C., FISCHER A., BENSUSSAN N.C., RUEMMELE F., HUGOT J.-P. et LATOUR S., « Characterization of Crohn disease in X-linked inhibitor of apoptosis-deficient male patients and female symptomatic carriers », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 2014, 1131-1141.e9, DOI : 10.1016/j.jaci.2014.04.031.

AUDRAIN M., THOMAS C., MIRALLIE S., BOURGEOIS N., SEBILLE V., RABETRANO H., DURAND-ZALESKI I., BOISSON R., PERSYN M., PIERRES C., MAHLAOUI N. et FISCHER A., « Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study », *Clinical Immunology*, 150(2), 2014, 137-139, DOI : 10.1016/j.clim.2013.11.012.

BIGORNE A.E., FARIN H.F., LEMOINE R., MAHLAOUI N., LAMBERT N., GIL M., SCHULZ A., PHILIPPET P., SCHLESSER P., ABRAHAMSEN T.G., OYMAR K., DAVIES E.G., ELLINGSEN C.L., LETEURTRE E., MOREAU-MASSART B., BERREBI D., BOLE-FEYSOT C., NISCHKE P., BROUSSE N., FISCHER A., CLEVERS H. ET DE SAINT BASILE G., « TTC7A mutations disrupt intestinal epithelial apicobasal polarity », *Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 2014, 328-337, DOI : 10.1172/JCI17471.

BODEMER C., SAUVAGE V., MAHLAOUI N., CHEVAL J., COUDERC T., LECLERC-MERCIER S., DEBRÉ M., PELLIER I., GAGNIEUR L., FRAITAG S., FISCHER A., BLANCHE S., LECUIT M. et ELOIT M., « Live rubella virus vaccine long-term persistence as an antigenic trigger of cutaneous granulomas in patients with primary immunodeficiency », *Clinical Microbiology and Infection*, 30 janvier 2014 [Epub], DOI : 10.1111/1469-0691.12573.

FISCHER A., « Gene therapy: Repair and replace », *Nature*, 510(7504), 2014, 226-227, DOI : 10.1038/nature13344.

FRANGE P., LERUEZ-VILLE M., NEVEN B., MASCARD L., MOSHOUS D., TOUZOT F., HERITIER S., CHAIX M.-L., CAVAZZANA M., CASANOVA J.-L., FISCHER A. et BLANCHE S., « Safety of hematopoietic stem cell transplantation from hepatitis B core antibodies-positive donors with low/undetectable viremia in HBV-naïve children », *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(4), 2014, 545-550, DOI : 10.1007/s10096-013-1982-x.

GÜNGÖR T., TEIRA P., SLATTER M., STUSSI G., STEPENSKY P., MOSHOUS D., VERMONT C., AHMAD I., SHAW P.J., TELLES DA CUNHA J.M., SCHLEGEL P.G., HOUGH R., FASTH A., KENTOUCHE K., GRUHN B., FERNANDES J.F., LACHANCE S., BREDIUS R., RESNICK I.B., BELOHRADSKY B.H., GENNERY A., FISCHER A., GASPAR H.B., SCHANZ U., SEGER R., RENTSCH K., VEYS P., HADDAD E., ALBERT M.H., HASSAN M. et Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, « Reduced-intensity conditioning and HLA-matched haemopoietic stem-cell transplantation in patients with chronic granulomatous disease: a prospective multicentre study », *Lancet*, 383(9915), 2014, 436-448, DOI : 10.1016/S0140-6736(13)62069-3.

KRACKER S., CURTIS J., IBRAHIM M.A.A., SEDIVA A., SALISBURY J., CAMPR V., DEBRÉ M., EDGAR J.D.M., IMAI K., PICARD C., CASANOVA J.-L., FISCHER A., NEJENTSEV S. et DURANDY A., « Occurrence of B-cell lymphomas in patients with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome », *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(1), 2014, 233-236. e3, DOI : 10.1016/j.jaci.2014.02.020.

LANZAROTTI N., BRUNEAU J., TRINQUAND A., STOLZENBERG M.-C., NEVEN B., FREGEAC J., LEVY E., JEREMIAH N., SUAREZ F., MAHLAOUI N., FISCHER A., MAGERUS-CHATINET A., CAVÉ H. et RIEUX-LAUCAT F., « RAS-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia », *Blood*, 123(12), 2014, 1960-1963, DOI : 10.1182/blood-2014-01-548958.

MARTIN E., PALMIC N., SANQUER S., LENOIR C., HAUCK F., MONGELLAZ C., FABREGA S., NITSCHKÉ P., ESPOSTI M.D., SCHWARTZENTRUBER J., TAYLOR N., MAJEWSKI J., JABADO N., WYNN R.F., PICARD C., FISCHER A., ARKWRIGHT P.D. ET LATOUR S., « CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation », *Nature*, 510(7504), 2014, 288-292, DOI : 10.1038/nature13386.

MIANO M., POGGI V., BANOV L., FIOREDDA F., MICALIZZI C., SVAHN J., MONTORBIO G., GALLICOLA F., MOLINARI A.C., PARASOLE R., PETRUZZIELLO F., FISCHER A., CALVILLO M. et DUFOUR C., « Sirolimus as maintenance treatment in an infant with life-threatening multiresistant pure red cell anemia/autoimmune hemolytic anemia », *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 36(3), 2014, e145-e148, DOI : 10.1097/MPH.0b013e31828d9928.

NEVEN B., BRUNEAU J., STOLZENBERG M.-C., MEYTS I., MAGERUS-CHATINET A., MOENS L., LANZAROTTI N., WELLER S., AMIRANOFF D., FLORKIN B., BADER-MEUNIER B., LEVERGER G., FERSTER A., CHANTRAIN C., BLANCHE S., PICARD C., MOLINA T.J., BROUSSE N., DURANDY A., RIZZI M., BOSSUYT X., FISCHER A. ET RIEUX-LAUCAT F., « Defective anti-polysaccharide response and splenic marginal zone disorganization in ALPS patients », *Blood*, 124(10), 2014, 1597-1609, DOI : 10.1182/blood-2014-02-553834.

RIVIÈRE J., HAUER J., POIROT L., BROCHET J., SOUQUE P., MOLLIER K., GOUBLE A., CHARNEAU P., FISCHER A., PÂQUES F., DE VILLARTAY J.-P. et CAVAZZANA M., « Variable correction of Artemis deficiency by I-SceI-meganuclease-assisted homologous recombination in murine hematopoietic stem cells », *Gene Therapy*, 21(5), 2014, 529-532, DOI : 10.1038/gt.2014.20.

SCHUETZ C., NEVEN B., DVORAK C.C., LEROY S., EGE M.J., PANNICKE U., SCHWARZ K., SCHULZ A.S., HOENIG M., SPARBER-SAUER M., GATZ S.A., DENZER C., BLANCHE S., MOSHOUS D., PICARD C., HORN B.N., DE VILLARTAY J.-P., CAVAZZANA M., DEBATIN K.-M., FRIEDRICH W., FISCHER A. ET COWAN M.J., « SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID », *Blood*, 123(2), 2014, 281-289, DOI : 10.1182/blood-2013-01-476432.

TOUZOT F., HACEIN-BEY-ABINA S., FISCHER A. et CAVAZZANA M., « Gene therapy for inherited immunodeficiency », *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(6), 2014, 789-798, DOI : 10.1517/14712598.2014.895811.

AUTRES ACTIVITÉS

Conférences principales

10-12 mars 2014 : deux conférences à l'Institut Weizmann (Israël) sur de nouvelles formes de déficits immunitaires (DIH) et la thérapie génique des DIH.

30 avril 2014 : Conférence plénière lors de la réunion de l'Human Genome Organisation (HUGO) à Genève.

1-3 mai 2014 : deux conférences lors de la réunion du groupe nord-américain d'études des DIH (Seattle).

31 mai-1^{er} Juin 2014 : deux conférences lors du symposium organisé par l'université d'Ulm sur l'immunopathologie.

12 juin 2014 : « Nobel Conference » à Stockholm en immunologie, conférence plénière.

16 juin 2014 : Participation à la journée scientifique organisée à l'occasion du départ en retraite de Claudine Schiff au Centre d'immunologie de Marseille Luminy.

Responsabilités

Activités éditoriales comme membre du comité éditorial (jusqu'en avril) de *Science Magazine*.

Activités éditoriales au *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (JACI).

Éditeur associé pour *Annual Review of Immunology*.

Organisation de séminaires au sein de l'Institut des maladies génétiques (Imagine).

Organisation du séminaire annuel d'immunologie à l'Hôpital Necker enfants malades le 11 avril 2014

Participation au comité scientifique du LABEX (DC Biol), Institut Curie, le 26 juin 2014.

Présidence du conseil d'administration de la Fondation Rothschild (Institut de biologie, physique et chimie).

Distinction

Obtention du Prix Robert Koch (Berlin).

