

## Immunologie moléculaire

M. Philippe KOURILSKY, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

### I. Enseignement

Les enseignements de l'année universitaire 2005-2006 ont été donnés en totalité à l'étranger (en Algérie et en Chine). Ils ont repris plusieurs des grands thèmes exposés les années précédentes. Ceux-ci ont été organisés dans une synthèse destinée à mieux faire comprendre les problématiques et les enjeux des questions de spécificité au sein du système immunitaire, et leur application au domaine de la vaccination.

### II. Conférences et Colloques, Interventions Publiques entre novembre 2005 et septembre 2006

26 novembre 2005	« La Vaccination » ; allocution prononcée lors de la remise du diplôme du D. Honoris Causa de l'Université de Quebec (Canada)
28 novembre 2005	« Le principe de précaution » ; Colloque du Conseil d'État, à Paris
3 janvier 2006	« Les maladies négligées » ; Cours donné au Conservatoire National des Arts et Métiers, à Paris
8 février 2006	« Neglected diseases : too poor to be treated » ; réunion organisée par le Parlement Européen, à Bruxelles
7 mars 2006	« Research and Development : future trends » ; 40th anniversary of KIST (Korean Institute of Science and Technology), à Seoul (Corée du Sud)
13 mars 2006	Conférence internationale sur la santé ; ministère des Affaires étrangères, à Paris
31 mars 2006	« Immune repertoires » ; Immunology symposium, à Singapour
17 mai 2006	« Grand Angle sur l'avenir », à Paris
8 juillet 2006	« Sur le problème de l'eau dans le monde » ; Forum des Économistes, à Aix-en-Provence
1 <sup>er</sup> septembre 2006	« Optimiser l'action de la France pour l'amélioration de la santé mondiale ; le cas de la surveillance et de la recherche sur les maladies infectieuses » ; Colloque de l'ASPROCOP, à Paris

### III. Recherche

Notre activité de recherche est centrée sur l'étude de la diversité des répertoires des lymphocytes T et B et sur les mécanismes impliqués dans l'induction et le maintien de la mémoire immunitaire dans le contexte de pathologies infectieuses, de cancers, ou de maladies autoimmunes. Nous concentrons nos recherches sur plusieurs points : 1. caractérisation cellulaire et moléculaire de l'induction, du maintien et de la persistance de la mémoire immunitaire induite par des virus non persistants, persistants, ou par des préparations vaccinales ; 2. étude de la diversité des répertoires des lymphocytes T et B dans des situations physiologiques et pathologiques ; 3. étude des stratégies développées par les virus, notamment le VIH, pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Par ailleurs, nous avons mis en place en 2005, au sein de l'unité, un laboratoire spécifiquement dédié à l'évaluation des réponses immunitaires de patients enrôlés dans des essais cliniques (immunothérapies, chimiothérapies), ou de volontaires sains enrôlés dans des essais vaccinaux dans le cadre du développement de nouveaux candidats vaccins à l'Institut Pasteur.

#### A. Caractérisation de la mémoire immunitaire en réponse à une infection virale ou à un vaccin

(Anne Bristeau-Leprince, Fabrice Lemâtre, François Huetz)

Les facteurs immunologiques contribuant à l'induction et au maintien de lymphocytes T mémoires spécifiques d'un antigène donné sont encore très mal connus, et leur étude est essentielle au développement de nouveaux vaccins qui doivent induire une protection immunologique à long terme contre les agents pathogènes. Dans un modèle murin permettant d'étudier les cellules mémoires centrales TCD8 CM et mémoires effectrices TCD8 EM spécifiques du peptide mâle Smcy3 présenté par H2-Db, nous avons montré que deux tiers des clones TCM et TEM dérivent d'un précurseur commun naïf. Par ailleurs, leur comportement *in vivo* est distinct : les clones TCM sont stables en absence de re-stimulation, et ils répondent fortement à un challenge antigénique, au contraire des TEM qui ne persistent pas en absence d'antigène et ne répondent pas à un challenge. Ces résultats révèlent que les deux populations TCM et TEM ont des comportements drastiquement différents, et suggèrent que la qualité plutôt que la quantité de cellules mémoires doit être prise en compte, notamment dans les essais d'immunisation vaccinale chez l'homme. Nous étudions par ailleurs les composantes de la mémoire induite par le virus de la rougeole et par le vaccin rougeoleux. La mémoire vaccinale persiste pendant de nombreuses années, et les facteurs contribuant à son induction et son maintien sont mal connus. Nous avons donc développé un certain nombre d'outils moléculaires afin d'étudier ces facteurs, notamment en utilisant des tétramères peptides-molécules HLA, des approches de cytométrie en flux multiparamétrique, des études de répertoire du récepteur T pour l'antigène viral ou vaccinal avec la méthode « Immunoscope ».

## **B. Influence de l'activité enzymatique de la Terminale déoxynucléotidyl Transférase (TdT) sur les répertoires V-alpha et V-beta publics**

*(Nicolas Fazilleau, Fabrice Lemaitre, Jean Kanellopoulos)*

L'enzyme TdT catalyse l'addition de nucléotides aux extrémités codantes des segments de gènes du TCR. Dans le but de quantifier la contribution de cette enzyme sur la diversité des TCR, nous avons estimé la taille du répertoire des cellules  $T\alpha\beta$  chez des souris Tdtko. Les rates de souris naïves contiennent environ 105 TCR distincts à un moment donné, ce qui correspond à 5-10 % de la taille du répertoire T calculée chez les souris de génotype sauvage. La TdT est à l'origine d'au moins 90 % de la diversité du  $TCR\alpha\beta$ . Lors d'une réponse lymphocytaire T contre un complexe CMH-peptide, les lymphocytes T spécifiques portent des TCR publics dont les réarrangements  $V\alpha-J\alpha$  et/ou  $V\beta-D\beta-J\beta$  sont communs à tous les individus d'un même haplotype. Les réarrangements publics  $V\alpha-J\alpha$  et  $V\beta-D\beta-J\beta$  spécifiques de trois épitopes antigéniques sont identiques chez les souris Tdtko et sauvages, et les séquences des CDR3 publics des souris TdT+/+ et Tdtko présentent de fortes homologies entre elles. Par ailleurs, malgré la baisse de diversité de 15 à 20 fois chez les souris Tdtko, une maturation d'avidité des réponses T secondaires est observée. Nos résultats suggèrent donc que les répertoires T publics sont majoritairement indépendants de la TdT.

## **C. Étude de la diversité des répertoires T et B par l'approche Immunoscope et suivi clonotypique *in vivo***

*(Annick Lim, Brigitte Lemercier, Xavier Wertz, François Huetz)*

Depuis sa conception (1992), l'approche Immunoscope a été améliorée sans relâche, afin de la rendre apte au suivi clinique des réponses T chez l'homme, dans diverses situations pathologiques, ou dans des essais d'immunothérapie. Parmi les additions les plus importantes qui ont été réalisées figurent : (a) l'inclusion de méthodes réellement quantitatives ; (b) l'adjonction d'un module de séquençage à haut débit ; (c) la combinaison de l'analyse Immunoscope à un tri de cellules T spécifiques d'antigène grâce à des tétramères de molécules HLA de classe I ou de classe II chargés avec des peptides définis ; (d) la définition de protocoles adaptés à un suivi clinique prospectif et rétrospectif. Le développement récent de l'approche Immunoscope pour les cellules B étend le champ d'intervention de cette technologie à d'autres situations cliniques et au suivi d'essais vaccinaux. Par exemple, l'approche Immunoscope nous a permis de révéler l'expansion clonale de cellules T matures chez des enfants dont le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (SCID-X1) a été corrigé par le transfert de cellules souches CD34+ transduites avec le gène  $\Gamma_c$ , déficient chez ces enfants. Elle a aussi permis de montrer que dans le cas d'une thérapie adoptive chez des patients souffrant de mélanome, l'injection de clones T autologues spécifiques de l'antigène Melan-A/Mart1 permettait le recrutement de nouveaux

clones anti-tumoraux associé à la régression de la tumeur. Des études sont en cours sur l'impact d'un traitement anti-IgE sur la restauration de la diversité du répertoire B IgE chez des patients souffrant d'eczéma atopique.

#### **D. Étude des stratégies d'échappement au système immunitaire développées par le VIH : rôle des récepteurs NK inhibiteurs**

*(Peggy Masdehors-Taoui, Pauline Gardès, Delphine Marsac)*

Les récepteurs inhibiteurs des molécules CMH de classe I (iNKR) sont exprimés par des cellules NK (natural killers) mais aussi par une sous-population de cellules T CD8 mémoires. Ces récepteurs exercent sur les lymphocytes T CD8 un contrôle négatif lors de leur stimulation antigénique, et nous posons la question de leur rôle éventuel dans l'échappement viral. Nous avons montré que l'infection par le VIH entraîne une augmentation de l'expression de ces récepteurs à la surface des lymphocytes T CD8 chez des personnes VIH+ chroniquement infectées. Cette régulation positive est induite par la réplication virale, et elle inhibe les fonctions effectrices (prolifération, expression de perforine, synthèse de cytokines) des T CD8 spécifiques de peptides du VIH. Des études sont en cours pour définir l'impact des traitements anti-rétroviraux sur ces récepteurs. Ces observations suggèrent que le défaut fonctionnel reconnu des cellules T CD8 spécifiques du VIH est au moins en partie lié à la régulation positive des iNKR à leur surface.

#### **E. Influence de l'immunothérapie par l'IL-2 sur la dynamique des cellules T CD4 et les fonctions antivirales des cellules T CD8 chez des patients VIH+**

*(Béatrice Poirier-Baudoin, Peggy Masdehors-Taoui, Valérie Seffer, Pierre-Henri Commere, en collaboration avec le Pr Yves Levy, Hôpital Henri Mondor, Créteil)*

La combinaison de molécules anti-rétrovirales inhibant la transcriptase inverse et la protéase du VIH s'avère efficace chez une fraction importante de patients chroniquement infectés par le VIH. Elle induit une suppression de la charge virale plasmatique et une restauration du nombre de lymphocytes T CD4. Cependant ces traitements sont limités par leur toxicité, responsable de complications métaboliques sévères. Dans le but de promouvoir la restauration quantitative et qualitative du pool des lymphocytes T CD4, ces traitements ont été associés à une immunothérapie par l'IL-2, cytokine immunostimulante jouant un rôle central dans l'induction et le maintien d'une immunité antivirale. Afin de comprendre les mécanismes homéostatiques qui contribuent à la restauration immunitaire chez les patients recevant de l'IL-2, nous avons développé différentes approches permettant de détecter *ex-vivo* des cellules récemment produites par le thymus (TREC), d'identifier des cellules subissant une prolifération homéostatique ou une mort programmée par apoptose. En parallèle, l'immunité antivirale a été analysée par une analyse multiparamétrique en cytométrie de flux après stimulation des lymphocytes de patients par des antigènes viraux. Dans le cadre de trois

essais cliniques (ANRS 048, ANRS 079, Silcaat), nous avons ainsi montré que la dynamique des lymphocytes T CD4 est modifiée sous l'effet de l'IL-2, notamment en agissant sur leur survie et en induisant leur expansion périphérique, et l'immunothérapie par l'IL-2 permet de maintenir sur le long terme des cellules effectrices spécifiques du VIH. Actuellement deux essais cliniques sont en cours d'évaluation immunologique dans notre unité (ANRS 118, ANRS 119).

### **F. Essai vaccinal SC599 de phase II contre la Shigellose**

*(Béatrice Poirier, Valérie Seffer, Luct Henno)*

La Shigellose touche 164 millions de personnes par an dans le monde, la majorité se situant dans les pays en voie de développement. Plus d'un million de personnes meurent de shigellose chaque année, 60 % étant des enfants. Le développement d'un vaccin représente une stratégie essentielle de lutte contre cette infection qui se développe dans le cadre de mauvaises conditions d'hygiène. L'essai vaccinal SC599 de phase II en double aveugle contre placebo évalue la tolérance chez des volontaires adultes sains, et compare l'immunogénicité de deux doses d'un vaccin contre *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (SD1), ce vaccin étant constitué de la bactérie vivante atténuée et génétiquement modifiée. Cent onze volontaires sont enrôlés dans deux centres (le centre vaccinal Pasteur-Cochin à Paris et le St George Vaccine Center à Londres), et la réponse vaccinale de ces volontaires est évaluée par notre laboratoire pour les volontaires Parisiens et le laboratoire du Dr. David Lewis pour les volontaires Londoniens. Deux critères d'immunogénicité sont mesurés : 1. la fréquence des lymphocytes B exprimant des IgM, IgG, IgA spécifiques du LPS de SD1, mesurée par la technique Élispot, développée dans notre laboratoire ; 2. la réponse humorale spécifique de SD1 et de la sous-unité B, les taux d'anticorps de différents isotopes étant mesurés par une technique Élisa spécifiquement mise au point. Le critère principal de jugement est le nombre de cellules B formant des spots IgA anti-SD1. Cet essai vaccinal est en cours de réalisation et devrait être terminé courant 2006.

### **G. Allergie au pollen de frêne : étude immunochimique**

*(Pascal Poncet, en collaboration avec Gabriel Peltre, ESPCI, et Jean-Michel Wal, INRA)*

Le frêne (*Fraxinus excelsior*) induit, du Nord au Sud de l'Europe à la fin de l'hiver, une pollinisation importante responsable de rhinites, conjonctivites et asthmes allergiques (70 % des cas). Afin d'identifier les allergènes du pollen de frêne et pour déterminer le profil de sensibilisation de différents patients allergiques aux pollens, nous avons analysé par western blot mono- ou bi-dimensionnel le profil de réactivité des IgE sériques de 62 patients diagnostiqués pour une allergie au pollen de frêne, de troène, d'olivier, ou de graminées. Certaines protéines ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse. Nous montrons que 92 % des patients allergiques au frêne ont des IgE reconnaissant Fra e 1, l'allergène majeur du frêne, et 46 % reconnaissent la profiline. Les allergènes

d'un extrait soluble de pollen de frêne peuvent se répartir en 5 zones en fonction de leur point isolélectrique, définissant ainsi l'allergome du pollen de frêne. La spectrométrie de masse a permis d'identifier 10 protéines non reconnues par les IgE des sérums qui ont permis de définir l'allergome du frêne. Ce travail contribue à une meilleure définition des allergènes du pollen de frêne et de la sensibilisation qu'ils induisent, et l'étude de la pertinence diagnostique et thérapeutique de chacun de ces composants peut avoir un impact sur la prédiction de l'évolution des symptômes des patients allergiques et sur l'élaboration d'un traitement (vaccination allergique).

PUBLICATIONS DE L'UNITÉ

BOUNEAUD C., GARCIA Z., KOURILSKY P., PANNETIER C. : Lineage relationships, homeostasis, and recall capacities of central- and effector-memory CD8 T cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2005 Feb. 21 ; 201 (4) : 579-90. Epub. 2005 Feb. 14.

ROHRLICH P.S., FAZILLEAU N., GINHOUX F., FIRAT H., MICHEL F., COCHET M., LAHAM N., ROTH M.P., PASCOLO S., NATO F., COPPIN H., CHARNEAU P., DANOS O., ACUTO O., EHRLICH R., KANELLOPOULOS J., LEMONNIER F.A. : Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005 Sept. 6 ; 102 (36) : 12855-60. Epub. 2005 Aug. 25.

DE LA COSTE A., SIX E., FAZILLEAU N., MASCARELL L., LEGRAND N., MAILHE M.P., CUMANO A., LAABI Y., FREITAS A.A. : *In vivo* and in absence of a thymus, the enforced expression of the Notch ligands delta-1 or delta-4 promotes T cell development with specific unique effects. *J. Immunol.*, 2005 Mar. 1 ; 174 (5) : 2730-7.

FAZILLEAU N., CABANIOLS J.P., LEMAITRE F., MOTTA I., KOURILSKY P., KANELLOPOULOS J.M. : Valpha and Vbeta public repertoires are highly conserved in terminal deoxynucleotidyl transferase-deficient mice. *J. Immunol.*, 2005 Jan. 1 ; 174 (1) : 345-55.

MEIGNIN V., DE LATOUR R.P., ZUBER J., REGNAULT A., MOUNIER N., LEMAITRE F., DASTOT H., ITZYKSON R., DEVERGIE A., CUMANO A., GLUCKMAN E., JANIN A., BANDEIRA A., SOCIE G. : Numbers of Foxp3-expressing CD4+CD25 high T cells do not correlate with the establishment of long-term tolerance after allogeneic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.*, 2005 Aug. ; 33 (8) : 894-900.

DE VILLARTAY J.P., LIM A., AL-MOUSA H., DUPONT S., DECHANET-MERVILLE J., COUMAU-GATBOIS E., GOUGEON M.L., LEMAINQUE A., EIDENSCHENK C., JOUANGUY E., ABEL L., CASANOVA J.L., FISCHER A., LE DEIST F. : A novel immunodeficiency associated with hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection. *J. Clin. Invest.*, 2005 Nov. ; 115 (11) : 3291-9.

VIGNARD V., LEMERCIER B., LIM A., PANDOLFINO M.C., GUILLOUX Y., KHAMMARI A., RABU C., ECHASSERIEAU K., LANG F., GOUGEON M.L., DRENO B., JOTE-REAU F., LABARRIERE N. : Adoptive transfer of tumor-reactive Melan-A-specific

CTL clones in melanoma patients is followed by increased frequencies of additional Melan-A-specific T cells. *J. Immunol.*, 2005 Oct. 1 ; 175 (7) : 4797-805.

SCHMIDT M., HACEIN-BEY-ABINA S., WISSLER M., CARLIER F., LIM A., PRINZ C., GLIMM H., ANDRE-SCHMUTZ I., HUE C., GARRIGUE A., LE DEIST F., LAGRESLE C., FISCHER A., CAVAZZANA-CALVO M., VON KALLE C. Clonal evidence for the transduction of CD34+ cells with lymphomyeloid differentiation potential and self-renewal capacity in the SCID-X1 gene therapy trial. *Blood.*, 2005 Apr. 1 ; 105 (7) : 2699-706. Epub. 2004 Dec. 7.

GOUGEON M.L. : To kill or be killed : how HIV exhausts the immune system. *Cell. Death Differ.*, 2005 Aug. ; 12 Suppl. 1 : 845-54.

WERTZ X., SCHOEVAERT D., MAITOURNAM H., CHASSIGNET P., SCHWARTZ L. The effect of hormones on bone growth is mediated through mechanical stress. *C R Biol.* 2006, 329 (2) : 79-85.

LAGRESLE-PEYROU C., YATES F., MALASSIS-SERIS M., HUE C., MORILLON E., GARRIGUE A., LIM A., HAJDARI P., STOCKHOLM D., DANOS O., LEMERCIER B., GOUGEON M.L., RIEUX-LAUCAT F., DE VILLARTAY J.P., FISCHER A., CAVAZZANA-CALVO M. Long-term immune reconstitution in RAG1-deficient mice treated by retroviral gene therapy : a balance between efficiency and toxicity. *Blood.* 107 (1) : 63-72, 2006.

FAZILLEAU N., DELARASSE C., SWEENIE C.H., ANDERTON S.M., FILLATREAU S., LEMONNIER F.A., PHEM-DINH D., KANELLOPOULOS J.M. Persistence of autoreactive myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-specific T cell repertoires in MOG-expressing mice. *Eur. J. Immunol.* 36 (3) : 533-43, 2006.

LE DEIST F., DE VILLARTAY J.P., LIM A., DECHANET J., FISCHER A. Hypomorphic RAG1 mutations and CMV infection : a new phenotype of severe combined immunodeficiency. *Med Sci*, 22 (3) : 239-40, 2006.

RIEUX-LAUCAT F., HIVROZ C., LIM A., MATEO V., PELLIER I., SELZ F., FISCHER A., LE DEIST F. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N Engl. J. Med.* 354 (18) : 1913-21, 2006.

THOMAS D.Y., JARRAUD S., LEMERCIER B., COZON G., ECHASSERIEAU K., ETIENNE J., GOUGEON M.L., LINA G., VANDENESCH F. Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. *Infect. Immun.* August 2006.

RITSOU E., BREITKREUTZ R., BENNER A., BÖHLER T., WEIGAND M.A., WALCZAK H., GOUGEON M.L., KRAMMER P.H.

CXCR4-induced cell death in AIDS. *Cell Death Diff.* 2006, in press.

#### IV. Rapports au gouvernement

- Membre du groupe de travail présidé par M. Michel Peberau, Président BNP Paribas, et au rapport officiel rendu par ce dernier au ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie : « *Rompre avec la facilité de la dette publique.*

*Pour des finances publiques au service de notre croissance économique et de notre cohésion sociale* ». La Documentation française : 13/01/06.

- Auteur du rapport rendu aux ministres (ministre des Affaires étrangères ; ministre de la Santé et des Solidarités ; ministre délégué à l'Enseignement supérieur et à la Recherche) : « *Optimiser l'action de la France pour l'amélioration de la santé mondiale. Le cas de la surveillance et de la recherche sur les maladies infectieuses* » (27/03/06). En cours de parution à la Documentation française. Téléchargeable sur le site du Collège de France : [http://www.college-de-france.fr/site/imm\\_mol/p1149514627594.htm](http://www.college-de-france.fr/site/imm_mol/p1149514627594.htm)