

Immunologie moléculaire

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

L'enseignement de l'année 1999-2000 a été consacré aux « répertoires immunitaires ». La complexité du système immunitaire dérive de la diversité considérable des molécules et des cellules qui interviennent dans son fonctionnement. Parce que la plupart des molécules hautement spécifiques (notamment les anticorps et les récepteurs des cellules T) sont elles-mêmes portées ou produites par des cellules spécifiques (cellules B et cellules T respectivement), c'est bien au niveau des cellules et des interactions entre cellules qu'il faut rechercher la plupart des clés qui règlent le fonctionnement du système. Ce dernier, organisé, certes, autour de quelques organes majeurs (thymus, rate, moelle, ganglions, foie) n'en est pas moins « liquide » : l'organisme est parcouru de cellules qui migrent en tous sens dans les circuits sanguins et lymphoïdes, et peuvent infiltrer différents tissus.

La notion de répertoire renvoie à celle de catalogue. Dénombrer les différents types cellulaires, étudier leur différenciation, connaître les divers états fonctionnels possibles, contribuent à la description des répertoires immunitaires. La dimension ontogénique est capitale. C'est en effet grâce à la compréhension des règles qui en gouvernent la constitution que l'on peut appréhender une partie de ces gigantesques catalogues — faits, chez l'homme, de dizaines de millions d'éléments — et les organiser de façon compréhensible et utilisable.

Les objectifs premiers du cours ont donc été de décrire : (1) les différents types cellulaires impliqués dans l'immunité innée et adaptative, (2) la diversité de leurs états structurels et fonctionnels mais aussi (3) d'appréhender les interactions qui gouvernent la constitution des répertoires immunitaires au repos et expliquent les mécanismes des réponses immunes lors d'une stimulation par l'antigène.

*
**

Quels sont, tout d'abord, les acteurs moléculaires du système immunitaire, et peut-on les identifier tous ? Cette dernière question aurait paru déraisonnable il

y a seulement dix ans. Aujourd'hui, les avancées technologiques qui ont conduit au séquençage massif des génomes ont ouvert la voie à une description exhaustive de tous les gènes de l'homme, de la souris, et d'autres organismes comme la drosophile. L'importance de cette approche systématique est double. D'une part, au sein d'une espèce donnée, on découvre, souvent par homologie, de nombreux gènes qui n'avaient pas encore été identifiés dont on peut ensuite étudier le produit. C'est le cas du gène BlyS et de nombreuses chemokines. D'autre part, les comparaisons des séquences de gènes entre des espèces aussi lointaines que l'homme, la souris, et la drosophile, révèlent des conservations structurales — et souvent fonctionnelles — qui peuvent être éclairantes. C'est ainsi que l'on commence à tracer un arbre évolutif de l'immunité innée, la seule qui existe dans les espèces dites primitives, mais que l'on retrouve chez l'homme où elle joue un rôle probablement plus actif qu'on ne l'a imaginé. L'immunité adaptative apparaît quant à elle comme un ajout plus tardif, daté à l'émergence des poissons avec mâchoire. Ceci étant, l'approche génétique connaît quelques limites et, notamment, celle d'être en général impuissante à prédire les modifications post-traductionnelles parfois très inattendues (tel le relargage de cytokines par clivage d'une tARN synthétase). En outre, il existe un certain degré de recouvrement entre le système immunitaire (et donc les molécules qu'il met en jeu) et d'autres sphères de l'organisme, tout particulièrement le système neuroendocrinien. Il est intéressant de voir se dessiner des ponts (*e.g.* les sémaphorines, ou l'implication de certaines enzymes dans la recombinaison des gènes d'anticorps et du développement du système nerveux); et il y aura sans doute des rapprochements instructifs à faire entre des familles de récepteurs immunitaires et d'autres familles tels que celles des récepteurs de l'olfaction et des récepteurs chemosensoriels.

**

Si on cherche maintenant à dénombrer les types cellulaires, on trouve un certain nombre de classes majeures : macrophages, monocytes, cellules dendritiques, cellules NK, cellules B et T, etc. Une mention particulière doit être faite de sous-types qui apparaissent aujourd'hui comme exotiques, du fait que leur fonction est mal connue. Il s'agit, notamment, des cellules B1, des cellules T gamma,delta des cellules NKT dont les propriétés sont encore mystérieuses. Ainsi, certaines cellules T gamma, delta répondent à des phospholigands et à des alkylamines sans que la signification biologique soit bien comprise. Ces acteurs cellulaires existent tous dans au moins deux états fonctionnels : au repos et dans au moins un état activé. Il existe plusieurs cascades d'activation qui font intervenir des chaînes d'acteurs cellulaires et qui sont aujourd'hui bien documentées. Au centre du processus d'activation primaire se trouvent les cellules dendritiques. Plus bas dans la cascade se situe l'interaction entre les cellules B et T fondée sur l'étonnant lien cognitif entre l'antigène, l'anticorps spécifique de ce dernier, un peptide dérivé de l'antigène et le récepteur T spécifique du complexe

que forme ce dernier avec la molécule du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) qui le présente.

Les phénomènes de désactivation ne sont pas moins importants que les phénomènes d'activation. Les proliférations cellulaires associées aux réponses immunitaires sont évidemment contrôlées, et le retour à la normale se traduit par l'élimination d'un grand nombre de cellules selon un processus de mort programmée (apoptose). La désactivation réversible d'une petite fraction de cellules aboutit au maintien d'une population de cellules B et T dites « mémoire » qui, en cas de stimulation ultérieure par le même antigène, sont capables de déclencher une réponse beaucoup plus rapide et constituent le fondement de la vaccination.

Plusieurs mécanismes majeurs sous-tendent les processus d'activation et de désactivation. Les agrégations moléculaires de surface se traduisent, sur le versant cytoplasmique de la membrane cellulaire, par des rapprochements de domaines spécifiques de telle ou telle kinase (ou phosphatase) qui déclenchent (ou inhibent) des cascades de signaux fondés sur la phosphorylation (ou la déphosphorylation) d'un certain nombre de molécules. L'existence même de ces cascades moléculaires interroge sur l'organisation fine du cytoplasme. Les cascades aboutissent, pour beaucoup, au noyau, avec activation (ou extinction) de l'expression de gènes spécifiques *via* des facteurs de transcription. L'apoptose est distincte de la nécrose, et a des conséquences immunologiques bien différentes. Les membranes restant plus ou moins intactes, les cellules apoptotiques ne disséminent pas les pathogènes qui les ont infectées. Les corps apoptotiques ont des propriétés remarquables, notamment celle d'être efficacement captés par les cellules dendritiques, ce qui conduit à une re-présentation de l'antigène. L'intervention des caspases dans l'apoptose, de même que celle des mitochondries et du cytochrome c qu'elles renferment, sont maintenant bien documentées. Le contrôle de l'apoptose est un enjeu important des stratégies thérapeutiques. À titre d'exemple, il a été trouvé que dans le cancer du poumon à petites cellules, la résistance à la chimiothérapie qui provoque l'apoptose, pourrait être liée à l'existence d'un abondant stroma de matrice extracellulaire inhibiteur de l'apoptose.

**

Les cytokines et les chemokines constituent deux classes d'agents régulateurs d'une très grande importance. En contribuant à régler les migrations de cellules immunitaires, les chemokines participent à l'ampleur et à la spécificité des réponses. Par exemple, les cellules apoptotiques relarguent des molécules qui attirent des cellules phagocytaires. D'autres chemokines attirent les cellules T et B. On connaît de façon assez approfondie une vingtaine de cytokines, dotées chacune de récepteurs et de propriétés spécifiques. L'étude d'une sous-catégorie de cellules T a montré dans les années 90 que l'expression de ces cytokines par les cellules baptisées Th1, Th2 puis Th0 et Th3, correspondait à des profils relativement réguliers, le profil Th1 étant dominé par l'IL-4 et le profil Th2 par

l'interféron gamma et l'IL-12. L'analyse bibliographique faite à ce propos nous a conduit à proposer une hypothèse synthétique, qui fera l'objet d'une publication séparée. En bref, selon cette théorie du « champ de cytokines », le micro-environnement créé par la sécrétion de cytokines spécifiques autour d'une ou d'un petit groupes de cellules, s'impose aux acteurs cellulaires recrutés dans le champ. À défaut, en effet, se produirait une cacophonie cytokinique qui serait fonctionnellement délétère. Le modèle prédit donc que les divers acteurs cellulaires (cellules dendritiques, macrophages, cellules T, CD4⁺ ou Th, cellules T CD8⁺ ou Tc, cellules T gamma, delta, NK, NKT) possèdent tous la capacité soit d'induire un champ, soit de se conformer à un champ préexistant. Par nature donc, le champ de cytokine serait quasi-infectieux et susceptible de se propager par des conversions cellulaires successives. L'hypothèse ouvre donc la question — non résolue — de savoir si le champ (de type 1, 2 ou 3) peut ainsi envahir une partie d'un organe (un lobe de ganglion ou de rate), un organe entier, voire tout l'organisme, peut-être aussi grâce à la médiation des gluco-corticoïdes. Il y a là plusieurs prédictions vérifiables et les conséquences ne sont pas négligeables si on réfléchit, par exemple, aux conséquences systémiques d'infections disséminées. Un autre aspect intéressant consiste à relier cette problématique à celle de la micro-organogénèse vue comme une possible conséquence de l'inflammation. Enfin, on peut encore esquisser un lien avec la physiologie de certaines terminaisons nerveuses : les organes lymphoïdes comme la rate et les ganglions sont fortement innervés et quelques indications récentes corrélerent l'activité nerveuse à la synthèse locale d'IL-2.

**

Comment les acteurs cellulaires se reconnaissent-ils spécifiquement, et comment les médiateurs spécifiques interagissent-ils avec leurs récepteurs ? Cette question est, bien évidemment, au cœur du fonctionnement du système immunitaire. Pour l'aborder correctement, il faut d'abord s'être affranchi du mythe de la spécificité absolue. L'important en biologie n'est pas qu'un processus soit rigoureusement spécifique mais qu'il fonctionne avec un taux d'erreurs acceptable. En outre, la spécificité doit être comprise dans toutes ses dimensions, y compris de façon spatio-temporelle : une cellule tueuse qui se trouve localisée au bon endroit et activée au bon moment est, *de facto*, spécifique. La dynamique des interactions (et donc le K_{on} et le K_{off} des réactions) est essentielle. Enfin, la spécificité peut se construire le long d'un chemin fonctionnel, avec élimination progressive du bruit.

Les reconnaissances moléculaires peuvent s'accommoder d'un certain flou dans la complémentarité des structures qui s'apparient, comme l'illustrent la structure et le fonctionnement des chaperonnes (telles que la molécule GroEL). Les complexes CMH-peptide constituent un système à reconnaissance multiple, chaque molécule du CMH étant capable d'accommoder des myriades de peptides

différents, mais qui ne représentent néanmoins qu'une fraction de tous les peptides possibles. Le système du CMH est en outre polymorphe. Physiologiquement, les peptides rares ne peuvent avoir un rôle immunologique dans les réponses immunitaires que si leur temps de résidence à la surface des cellules est suffisant, *i.e.* si le K_{off} n'autorise pas une dissociation trop rapide. La reconnaissance du complexe CMH-peptide par le récepteur T est, de façon surprenante, fondée sur une réaction de faible affinité. La lenteur des cinétiques d'association conduit à soupçonner que des ajustements conformationnels se produisent à l'interface, ce qui serait de nature à faciliter des réactions croisées : un même récepteur T pourrait donc reconnaître plusieurs complexes (peptides) différents. Les anticorps reconnaissent leur antigène de façon généralement stricte. Encore faut-il distinguer les anticorps produits lors de la réponse primaire de ceux qui portent des mutations somatiques qui pourraient, dans certains cas, émerger des plus flexibles parmi les premiers.

La faible affinité du récepteur T pour le complexe CMH-peptide pose la question de savoir comment une cellule T spécifique, et non une autre, est activée lors d'une réponse immune, ou reconnaît sans erreur la cible, s'il s'agit d'une cellule tueuse cytolytique (T CD8⁺, en général). La réponse se trouve dans la synapse immunologique, structure d'interface entre deux cellules réagissantes, au sein de laquelle se produisent toutes sortes de mouvements et réarrangements successifs. On y observe notamment, une redistribution périphérique de molécules trop grandes pour que des récepteurs T adjacents puissent physiquement contacter les complexes CMH-peptides. Cette redistribution est concomitante d'une migration centripète de ces derniers. La synapse fonctionne très probablement selon des critères cinétiques dont le non-respect entraîne la dissociation de la synapse non entièrement formée. La succession des étapes est assortie d'autant de contrôles de qualité qui finissent par garantir une spécificité élevée.

**

Les répertoires immunitaires sont donc remarquablement complexes. La dimension du répertoire des cellules T chez l'homme, récemment mesurée dans notre laboratoire, excède 2×10^8 cellules portant des récepteurs T différents. Le nombre est élevé, mais est-il suffisant pour couvrir le champ des possibles, c'est-à-dire pour reconnaître tous les complexes CHM-peptide imaginables ? Des calculs élémentaires montrent que la réponse est négative, ce qui oblige à repenser la spécificité du système immunitaire en des termes un peu différents. Dans sa « vision » du monde extérieur, le système immunitaire opère, par nécessité, une réduction, réduction permise par une certaine dégénérescence des reconnaissances et l'existence de réactivités croisées — ce qui n'est pas sans conséquences possibles en terme de réactions adverses pour l'organisme, notamment celles qui peuvent être accidentellement induites par des réactivités croisées avec des agent opportunistes.

P. K.

SÉMINAIRES

Les séminaires ont été groupés en une série de conférences prononcées au cours d'un colloque intitulé « Stimulation et adjuvantation des réponses immunes », d'une journée à l'École Normale Supérieure de Lyon, le 17 avril 2000. Ces conférences ont été suivies d'une table ronde le matin du 18 avril.

Les séminaires ont été les suivants :

— J.-P. ABASTADO : *Thérapies cellulaires par des macrophages ou des cellules dendritiques dérivés de monocytes.*

— N. BURDIN : *Présentation de glycolipides aux lymphocytes T NK par les molécules CD4d : mécanismes et fonctions.*

— C. CAUX : *Chemokines et régulation de la migration des cellules dendritiques.*

— V. LOTTEAU : *Récepteurs de type « scavenger » et immunité.*

— I. MOTTA : *Cross-présentation par des cellules dendritiques d'un antigène tumoral exprimé dans des corps apoptotique.*

— C. RABOURDIN-COMBE : *Dysfonctionnement de la biologie des cellules dendritiques induit par le virus de la rougeole.*

— P. RICIARDI-CASTAGNOLI : *Bactéries intracellulaires et maturation des cellules dendritiques.*

— N. THIEBLEMONT : *Réponses immunitaires innées aux lipides bactériens : LPS et CD14.*

— E. TRANNOY : *Séquences CpG immunostimulatrices.*

— L. ZITVOGEL : *La cellule dendritique à la croisée des chemins : régulation des réponses immunitaires antitumorales innées et acquises.*

La table ronde a porté sur : « Application à la conception et au développement de nouveaux adjuvants ».

RÉSUMÉ DE L'ACTIVITÉ SCIENTIFIQUE

I. Vue d'ensemble

A. L'Unité de recherche associée à la Chaire d'Immunologie Moléculaire est à la fois une unité de l'Institut Pasteur et une unité de l'INSERM (U.277). Au plan thématique, cette unité était initialement portée vers la génétique (polymorphisme des gènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité ou CMH) et la régulation de l'expression des gènes (notamment ceux du CMH). L'unité s'est plus profondément orientée vers l'immunologie, lorsque la présentation des peptides antigéniques par les molécules du CMH de classe I a fourni une plateforme moléculaire aux hypothèses fonctionnelles. La théorie du soi peptidique

(1986) a daté cette inflexion. Nous avons alors diminué notre effort sur l'analyse du polymorphisme (d'où on trouve aujourd'hui les dernières séquelles en matière de recherches sur l'évolution) pour entreprendre (avec le Dr. J.-P. Abastado) l'étude des interactions entre molécules CMH-I et peptides. Ce travail a naturellement dérivé vers l'analyse de l'activation des cellules T. Le modèle du soi peptidique fut aussi fondateur d'une ligne de recherche sur l'immunité antitumorale, toujours poursuivie aujourd'hui. Les recherches sur la régulation de l'expression des gènes du CMH-I (qui culminèrent en 1990 avec le clonage de NF-kappaB), sous la direction du Dr. A. Israël, quittèrent en bloc le laboratoire lorsque ce dernier fonda sa propre unité, en 1992. L'effort mené sur les cellules T, notamment par le Dr. J. Kanellopoulos, fut alors amplifié, et la composante moléculaire qu'apportait le groupe d'A. Israël fut reconstituée autour de l'analyse des répertoires menée grâce à l'Immunoscope I. L'arrivée du Dr. A. Cumano permit d'ouvrir un axe orienté sur l'ontogenèse des cellules T. Son départ, en 1999, pour démarrer sa propre unité, ainsi que le départ du Dr. J.-P. Abastado qui, depuis 1999, dirige un laboratoire de recherche industrielle, ont conduit à renforcer et introduire de nouvelles thématiques, toujours liées aux cellules T. Dans le même temps, conformément au projet de re-création de l'U.277, dans le cadre de l'INSERM, en 1996, une attention plus vive était portée aux pathologies, comme en témoignent les travaux du Dr. G. Gachelin sur la formation de granulomes induits par des extraits de mycobactéries, et ceux du Dr. J. Even sur l'application des méthodes d'immunoscopie aux pathologies humaines et notamment aux cancers.

B. Ces évolutions proviennent d'un processus réfléchi, mûri collectivement au sein de l'Unité, et qui nous permet aujourd'hui de tracer les lignes de force du proche avenir.

Une première considération, banale, est qu'une fonction majeure du système immunitaire est, après tout, de combattre les pathogènes ; mais que la force et l'élégance des théories liées à l'immunité adaptative ont quelque peu occulté l'importance de l'immunité innée.

Une deuxième considération, toute aussi simple, revient à constater que la plupart des infections partent des muqueuses et que plus de la moitié des lymphocytes se trouvent au niveau de ces dernières. Un souci élémentaire de réalité qui ferait considérer l'immunologie sous un angle moins théorique, nous amène donc, tout naturellement, comme pour l'immunité innée, à élargir notre intérêt à l'immunité mucoale.

On ne s'étonnera pas non plus qu'une impulsion soit donnée à l'étude de la mémoire immunitaire T. Celle-ci est, comme chacun sait, essentielle pour la vaccination. De façon peut-être un peu moins évidente, on n'a sans doute pas pris suffisamment conscience de son importance dans l'immunothérapie des cancers. Ainsi, il est notable qu'à ce jour, elle n'est pas évaluée dans la quasi-totalité des essais cliniques d'immunothérapie anti-tumorale, pas plus d'ailleurs qu'on ne sait estimer jusqu'à quel point elle est affectée dans différentes patholo-

gies (cancéreuses ou infectieuses chroniques) ou par différents traitements. Nous avons donc décidé d'en faire un de nos axes de recherche tant chez la souris que chez l'homme.

Une dernière considération provient d'une réflexion sur le changement de dimension de certains équipements utilisés pour la recherche biologique. Ces changements d'échelle, particulièrement sensibles dans le domaine moléculaire, où ils sont tractés par les recherches sur les génomes, nous ont conduit à renforcer une de nos approches analytiques (l'immunoscopie). Grâce au soutien financier de la Ligue Nationale contre le Cancer, nous sommes donc en train de développer une plate-forme à haut débit de données qui devrait nous permettre de progresser dans nos divers projets. Cette plate-forme sera, bien entendu, ouverte à des groupes extérieurs lorsqu'elle sera fonctionnelle.

C. Le travail du laboratoire, tel qu'il se déroule aujourd'hui, peut donc être décliné selon les cinq axes décrits plus bas. Ces axes de recherche sont tous articulés autour de problématiques touchant aux cellules T, aux réponses immunitaires précoces et à la mémoire. Le tout est appuyé sur une plate-forme technologique destinée à alimenter les projets internes tout en étant ouverte vers l'extérieur.

Les cinq axes sont :

- 1) L'analyse des réponses T anti-tumorales et l'élaboration des protocoles d'immunothérapie centrés sur l'emploi des CTL (*Dr. L. Ferradini*).
- 2) Les réponses immunitaires précoces aux glycolipides bactériens et leur articulation avec l'immunité adaptative (*Dr. G. Gachelin*).
- 3) L'analyse des populations de cellules T impliquées dans les réponses immunitaires systémiques et mucosales (*Dr. D. Guy-Grand*).
- 4) L'étude des répertoires de lymphocytes T murins et de leur sélection dans le thymus et la périphérie (*Dr. J. Kanellopoulos*).
- 5) La mémoire immunitaire (*Dr. P. Kourilsky et Dr. C. Pannetier*).

II. Activités des différents groupes

Équipe n° 1 :

Responsable : Laurent FERRADINI

Titre : Analyse des réponses T anti-tumorales : Protocoles d'immunothérapie centrés sur l'emploi des CTL

Cette équipe a pour objectifs : 1) de mieux comprendre les réponses antitumorales T chez la souris et chez l'homme ; 2) d'améliorer les méthodes moléculaires de suivi immunologique plus particulièrement dans les immunointerventions chez l'homme.

1) Chez la souris, nous avons procédé à une étude approfondie du modèle murin que constitue la tumeur P815. L'analyse détaillée de la réponse CTL anti-P815 a montré des réponses récurrentes (dites publiques) aux antigènes tumoraux P1A et PIE. Cette découverte a permis un suivi moléculaire de la réponse oligoclonale

spécifique. L'intensité de cette réponse publique n'est pas corrélée avec le rejet en réponse primaire, la corrélation étant meilleure lors de réponses secondaires. La sécrétion d'IL-2 intratumorale par injection de vecteurs Ad-IL-2 (Ad = adénovirus) suggère l'intervention de cellules effectrices non spécifiques en plus des réponses publiques spécifiques. L'injection d'Ad-IL12 est associée à une réponse locale spécifique efficace. Les techniques développées pour le suivi moléculaire des réponses anti-P815 à l'aide d'amorces nucléotidiques clonotypiques sont la base des approches de suivi d'immunothérapies humaines que l'Unité met en place.

2) Chez l'homme, nous avons étudié un grand nombre d'échantillons de tissus tumoraux et sanguins à l'aide des techniques Immunoscope mises au point dans le laboratoire. Une grande partie de l'effort a été consacrée à l'étude de répertoires T normaux ce qui est indispensable pour évaluer les changements induits par des protocoles d'immunothérapie. Différentes pathologies humaines ont été étudiées.

a) Répertoires humains normaux : des expansions clonales T CD8⁺CD45RO⁺ de spécificité inconnue et stables au cours du temps présentes chez l'adulte jeune en bonne santé sont augmentées en taille et en fréquence chez l'individu âgé. L'analyse par Immunoscope 1 de sang du cordon a révélé un répertoire polyclonal naïf et complètement formé sans expansions clonales. Une analyse de répertoires d'individus sains âgés (moyenne 75 ans) a révélé pour la première fois des expansions CD4⁺CD45RO⁺ absentes chez l'adulte jeune. Une estimation directe de la diversité des TCR alpha, beta par clonage et séquençage à saturation de bandes de CDR3 de tailles données (Immunoscope 2) révèle 2.5×10^7 combinaisons alpha, beta dans la totalité des cellules T alpha, beta et 2×10^5 dans la sous-population CD45RO⁺ (mémoire).

b) Polyarthrite rhumatoïde et CTL anti-EBV : l'analyse par Immunoscope 1 d'échantillons de synovie d'une patiente atteinte de Polyarthrite rhumatoïde a démontré pour la première fois la diffusion des mêmes clones dans les articulations atteintes et aussi dans le sang périphérique. Dans une collaboration avec l'U.463 de M. Bonneville il a été montré qu'une partie des expansions identifiées dans des liquides synoviaux correspondent à des cellules CD8⁺ CTL anti-EBV reconnaissant un peptide du transactivateur BMLF présenté par HLA-A2.1. Les expansions correspondent à un pic de taille de CDR3 donné utilisant un même TCRBV mais comprennent de nombreuses séquences de CDR3 différentes. L'isolement de clones CTL spécifiques par des tétramères A2-peptide BMLF dans les articulations et le sang de plusieurs patients A2.1+ a montré le caractère public de cette réponse ce qui, avec d'autres résultats, suggère une contribution importante des clonotypes publics aux répertoires dirigés contre des épitopes viraux dominants.

c) Mélanome : des virus canarypox exprimant Melan-A/MART-1 qui infectent des cellules dendritiques humaines induisent la formation de corps apoptotiques. Des cellules dendritiques non-infectées mises en présence des corps apoptotiques

sont capables d'apprêter les Ag et « cross-présenter » des peptides Melan-A/Mart-1.

De nombreux tétramères A2-peptides tumoraux et viraux ont été synthétisés et sont utilisés dans des projets du laboratoire, ainsi que pour des collaborations externes dans le suivi de protocoles d'immunothérapie antitumorale et de l'évolution des patients HIV+ et HCV+.



Équipe n° 2 :

Responsable : Gabriel GACHELIN

Titre : Réponse immunitaire aux glycolipides bactériens

Dans le domaine de la pathologie cancéreuse, la réponse efficace spontanée anti-mélanocytes, modèle d'une réponse efficace anti-mélanome, a été étudiée dans le naevus de Sutton. Ce travail s'inscrit dans la logique de nos travaux antérieurs sur lymphocytes T et autoimmunité. Nous avons montré que la régression des nevi était associée à l'expansion de quelques clones cytotoxiques présents dans tous les nevi en régression chez un patient donné. Selon une étude encore en cours, l'antigène est très probablement Melan-A/MART-1.

Dans le domaine de la pathologie infectieuse, au cours d'une étude *in vivo* sur les premières heures de l'infection vaginale de la souris par *Chlamydia trachomatis* nous avons montré l'importance de l'apoptose et de la sécrétion de TNF alpha dans l'initiation des signes cliniques de l'infection. Mais nous avons surtout travaillé sur un modèle expérimental de réponse granulomateuse à l'injection de parois déprotéinisées de *Mycobacterium tuberculosis* et montré que les lymphocytes qui infiltrent le granulome appartiennent presque tous à une sous-population T particulière, des lymphocytes T porteurs de marqueurs NK (cellules NKT). Des glycolipides, les phosphatidylinositol hexamannosides étaient responsables de la réponse granulomateuse et du recrutement des cellules NKT. En outre, ces cellules sont indispensables à la réponse granulomateuse sans pour autant que l'on puisse conclure à une activation classique par présentation de glycolipides par le MHC1b CD1d au TCR des cellules NKT. Enfin, la réponse granulomateuse locale est purement de type Th1. Elle est observée également après injection de bactéries tuées. Nous avons également montré que les glycolipides bactériens de diverses mycobactéries et de *Yersinia tuberculosis* et d'autres bactéries, mais pas les glycolipides de *T. cruzi* non plus que les glycolipides de souris ou de tumeurs murines, provoquaient une réponse granulomateuse riche en cellules NKT. La reconnaissance de glycolipides bactériens par les cellules NKT paraît ainsi être un événement précoce dans la réponse de l'hôte à certains agents bactériens. Ces observations donnent pour la première fois une fonction physiologique « objectivable » à cette sous-population lymphocytaire jusqu'ici énigmatique.

Du fait du rôle des cellules NKT dans la réponse granulomateuse de la souris à des mycobactéries, nous avons recherché si les homologues humains de ces cellules se retrouvaient dans les lésions granulomateuses cutanées humaines dues à *M. leprae*. Nous avons montré que ces lésions s'accompagnaient du recrutement local de cellules NKT, ce qui confirme le lien de ces cellules avec un matériel lié à la présence de mycobactéries. La lésion s'accompagne en outre de l'expansion polyclonale des seuls lymphocytes T portant une chaîne de TCR alpha 4 ou 16. Dans la sarcoidose en revanche, bien que les lésions soient si semblables à celles de la lèpre que le rôle étiologique de mycobactéries atypiques est souvent évoqué, les cellules NKT ne sont pas retrouvées. Il existe donc, au moins chez l'homme, un mécanisme alternatif n'utilisant pas les cellules NKT et responsable de la réponse granulomateuse (ce qui n'est pas inattendu). Sa contribution de mycobactéries à l'étiologie de la sarcoidose devient improbable.

Les propriétés de reconnaissance spécifique de l'antigène par le TCR des cellules NKT étant très mal connues, nous avons étudié la diversité de leur chaîne beta, et confirmé par une analyse moléculaire l'hétérogénéité des populations NKT présentes dans différents organes de souris. Nous avons enfin montré l'association de leur TCR particulier à une sous-population particulière, exclusive dans le thymus et le foie, et mêlée à d'autres populations de même phénotype apparent mais portant une famille différente de TCR, dans la moelle osseuse et la rate.

**

Équipe n° 3 :

Responsable : Delphine GUY-GRAND

Titre : Les lymphocytes T des muqueuses

La formation de cette équipe date du 1^{er} janvier 2000. Antérieurement dans l'U.429 de l'INSERM, le Dr. Guy-Grand a beaucoup contribué à décrire, chez la souris, les lymphocytes T qui peuplent la muqueuse intestinale, logés dans la lamina propria (LPL) ou intercalés entre les cellules épithéliales des villosités (LIE). Leurs TCRs et leurs corécepteurs permettent de distinguer plusieurs lignées majoritaires faites de lymphocytes a) TCRalpha,beta⁺, CD4⁺ ou CD8alpha,beta⁺, b) TCRalpha,beta⁺, CD8 alpha,alpha⁺, c) TCR delta,delta⁺, CD8 alpha,alpha⁺.

Les travaux les plus récents (dans l'unité 429) ont porté sur :

1) Le répertoire des lymphocytes muqueux CD4 et CD8beta (en collaboration avec l'Unité 277).

Les LIE et les LPL, soit CD4⁺, soit CD8alpha,beta⁺, expriment dans les deux localisations le même répertoire beta oligoclonal ; en outre, des clones de cellules activées (en division) ont le même répertoire dans le canal thoracique et l'épithélium. Les LIE, CD4 et CD8alpha,beta partagent donc une communauté d'origine (les cellules activées circulantes) et de réactivité aux antigènes avec ceux de la *lamina propria*.

2) La fonction des LIE :

Ce sont des cellules cytotoxiques et les LIE CD8alpha, alpha, TCRalpha, beta ou gamma, delta⁺, exercent à la fois des cytotoxicités de type T et de type NK.

Les LIE, à quelque lignée qu'ils appartiennent, sont capables par un mécanisme combinant cytotoxicité et synthèse de cytokines, de détruire les cellules épithéliales, présumées infestées ou non fonctionnelles. L'accélération du renouvellement épithélial, compensatoire, permet de restaurer l'intégrité de la barrière. Ces études sont aujourd'hui poursuivies dans le laboratoire.

**

Équipe n° 4 :

Responsable : Jean KANELLOPOULOS

Titre : Étude des répertoires de lymphocytes T murins et de leur sélection dans le thymus et la périphérie

Nous avons développé une méthode d'étude du répertoire des lymphocytes T complémentaire de la technique de l'Immunoscope I. Cette dernière s'est révélée très efficace pour évaluer la polyclonalité du répertoire des lymphocytes T et pour mettre en évidence des expansions oligo- ou mono-clonales mais elle ne permet pas de décrire les réarrangements distincts contenus dans un pic de CDR3 de longueur déterminée. Le développement d'une technique Immunoscope de deuxième génération a été entrepris pour obtenir des informations sur le nombre et sur les caractéristiques de séquences distinctes contenues dans un pic de CDR3 de taille donnée. Grâce à cette technique, plusieurs centaines de séquences nouvelles peuvent être obtenues et analysées chaque semaine. Nous avons démontré que la taille du répertoire des splénocytes normaux de souris était d'au moins 2×10^6 TcR distincts et que celle des lymphocytes T du sang humain était de 2×10^7 . Nous avons également étudié le répertoire T des souris invalidées pour les gènes de classe I polymorphes H-2K et H-2D. Ces travaux ont montré que chez les souris C57Bl/6, H-2K^{o/o}, H-2D^{o/o} ou double-KO (H-2K^{o/o}, H-2D^{o/o}), les répertoires des lymphocytes T CD8⁺ sélectionnés sur les molécules de classe Ia et de classe Ib ou sur les molécules de classe Ib seulement utilisent les différents réarrangements V.alpha et V.beta dans les mêmes proportions sans biais dans la distribution des CDR3 parmi toutes les combinaisons étudiées. De plus, nous avons estimé la taille des répertoires V.beta dans ces différentes lignées de souris. Nous avons observé que la taille du répertoire V.beta est proportionnelle au nombre de lymphocytes T CD8⁺ ce qui implique que la diversité des populations C8⁺ est comparable même quand leur nombre est profondément diminué (réduction de 90 % chez les animaux double-KO).

Nous avons récemment évalué la taille du répertoire V.beta chez des souris invalidées pour le gène de la didéoxynucléotidyl transférase terminale (TdT). Les valeurs trouvées montrent que la taille du répertoire est 10 à 15 fois plus petite que celle observée chez la souris de phénotype sauvage. Comme ces animaux

TdT^o ont des réponses immunes normales et résistent aux infections comme des souris de phénotype sauvage, nous avons voulu déterminer si une augmentation dans l'appariement à des chaînes alpha distinctes ne pouvait pas rétablir une taille normale de répertoire. Tel ne paraît pas être le cas.

En collaboration avec le groupe de T. Sasazuki (Japon), nous avons utilisé ces méthodes pour étudier le répertoire des thymocytes CD4⁺ sélectionnés *in vivo* chez des souris transgéniques qui présentent un seul complexe peptide-molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface des cellules exprimant les molécules de classe II du CMH. Nos études montrent qu'un seul complexe peptide-molécule de classe II est capable de sélectionner environ 10⁵ réarrangements V.beta différents et que les thymocytes CD4⁺ sélectionnés expriment un répertoire polyclonal comparable à celui des thymocytes sélectionnés normalement. De plus, la comparaison des séquences CDR3 de réarrangements V.beta-J.beta, observées chez les souris C57Bl/6 et transgéniques, met en évidence un biais d'utilisation des acides aminés à certaines positions du CDR3. Ces différences reflètent « l'empreinte » laissée, après la sélection positive, par le peptide unique fixé aux molécules de classe II.

**

Équipe n° 5 :

Responsable : Philippe KOURILSKY

Titre : Analyse des populations de lymphocytes T mémoire et effectrices et études des bases moléculaires de leur phénotype.

Au cours de ces quatre dernières années, l'unité a fourni un effort important pour accroître la panoplie d'outils nécessaires à l'investigation clinique. Si l'Immunoscope de première génération, tel qu'il avait été développé dans cette unité à partir de 1990, a bel et bien permis de détecter et d'analyser des expansions ou accumulations oligoclonales de lymphocytes T dans des échantillons cliniques variés, il présentait cependant certaines limitations importantes. Par exemple, l'Immunoscope ne donne aucune information sur la spécificité antigénique des expansions ou accumulations détectées, si bien qu'il est souvent hasardeux de conclure sur la pertinence clinique d'une expansion détectée dans un prélèvement. Ensuite, même le caractère oligoclonal d'une expansion était également difficile à certifier dans la mesure où les informations sur la séquence des réarrangements du récepteur d'antigène étaient difficilement accessibles.

Plusieurs de ces limitations ont été levées au cours des dernières années. Ainsi, l'unité a maîtrisé la technique de tri des lymphocytes T sur la base de la spécificité et était parmi les premières équipes au monde à produire les tétramères de complexes CMH-peptide requis, et à les utiliser chez l'homme et la souris. De même, l'Immunoscope de première génération a été complété d'un Immunoscope II qui permet d'étudier la diversité au niveau des séquences des réarrangements des gènes de TcR, et d'en apprécier la signification statistique. Enfin, les pre-

nières expériences visant à rendre l'Immunoscope totalement quantitatif (et non plus semi-quantitatif), ont été réalisées récemment par la maîtrise de l'amplification PCR cinétique.

Ces avancées ont notamment permis d'observer la variabilité de la réponse immunitaire primaire T vis-à-vis d'antigènes exprimés par des tumeurs chez la souris et d'en analyser les raisons. Elles ont également rendu possible des estimations de la diversité des répertoires des lymphocytes T chez la souris ainsi que chez l'homme, ou encore une mesure de la diversité engendrée par une seule cellule.

PUBLICATIONS

1999

APOSTOLOU, I., TAKAHAMA, Y., BELMANT, C., KAWANO, T., HUERRE, M., MARCHAL, G., CUI, J., TANIGUCHI, M., NAKAUCHI, H., FOURNIE, J.-J., KOURILSKY, P. & GACHELIN, G. : Murine natural KT cells contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (1999) 96, 5141-5146.

ARSTILA, T.P., CASROUGE, A., BARON, V., EVEN, J., KANELLOPOULOS, J. & KOURILSKY, P. : A direct estimate of the human alpha,beta T cell receptor diversity. *Science* (1999) 286, 958-961.

BARRAT, F.J., LE DEIST, F., BENKERROU, M., BOUSSO, P., FELDMANN, J., FISCHER, A. & DE SAINT BASILE, G. : Detective CTL1-4 cycling pathway in Chediak-Higashi syndrome : a possible mechanism for deregulation of T lymphocyte activation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (1999) 96, 8645-8650.

BELLIO, M., OLIVEIRA, A.C.S.C., MERMELSTEIN, C.S., CAPELLA, M.M., LEVRAUD, J.-P., KOURILSKY, P., DOS REIS, G.A., PREVIATO J.O. & MENDOCA-PREVIATO, L. : Costimulatory action of glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* : increased interleukin 2 (IL-2) secretion and induction of nuclear translocation of the nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1). *FASEB J.* (1999) 13, 1627-163

BELMANT, C., ESPINOSA, E., HALARY, F., APOSTOLOU, I., SICARD, H., PEYRAT, M.A., VERCELLONE, A., KOURILSKY, P., GACHELIN, G., POUPOT, R., BONNEVILLE, M. & FOURNIE, J.-J. : Conventional and non-conventional recognition of non-peptide antigens by T lymphocytes. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* (1999) 322, 919-8924

BOUR, H., MICHIELIN, O., BOUSSO, P., CEROTTINI, J.-C. & McDONALD, H.R. : Dramatic influence of Vbeta gene polymorphism on an antigen-specific CD8+ T cell response in vivo. *J. Immunol.* (1999) 162, 4647-4656

BOUR, H., PUISIEUX, I., EVEN, J., KOURILSKY, P., FAVROT, M., MUSETTE, P. & NICOLAS, J.-F. : T-cell repertoire analysis in chronic plaque psoriasis suggests an antigen-specific immune response. *Human Immunology* (1999) 60, 665-676.

BOUSSO, P. & KOURILSKY, P. : A clonal view of alpha,beta T cell responses. *Seminars in Immunology* (1999) 11, 423-431.

BOUSSO, P., LEVRAUD, J.-P., KOURILSKY, P. & ABASTADO, J.-P. : The composition of a primary T cell response is largely determined by the timing of recruitment of individual T cell clones. *J. Exp. Med.* (1999) 189, 1591-1600.

CALBO, S., GUICHARD, G., BOUSSO, P., MULLER, S., KOURILSKY, P., BRIAND, J.-P. & ABASTADO, J.-P. : Role of peptide backbone in T cell recognition. *J. Immunol.* (1999) 162, 4657-4662.

CAMBIAGGI, A., DARCHE, S., GUIA, S., KOURILSKY, P., ABASTADO, J.-P. & VIVIER, E. : Modulation of T-cell functions in KIR2DL3 (CD158b) transgenic mice. *Blood* (1999) 94, 2396-2402.

COLUCCI, F., TURNER, M., SCHWEIGHOFFER, E., GUY-GRAND, D., DI BARTOLO, V., SALCEDO, M., TYBULEWICZ, V.L.J. & DI SANTO, J.P. : Redundant role of the syk protein tyrosin kinase in mouse NK cell differentiation. *J. Immunol.* (1999) 163, 1769-1774.

COUTINHO-SILVA, R., PERSECHINI, P.M., DA CUNHA BISAGGIO, R., PERFETTINI, J.-L., TORRES DE SA NETO, A.C., KANELLOPOULOS, J.M., MOTTA-LY, I., DAUTRY-VARSAT, A. & OJCIUS, D.M. : P₂₂/P2X₇ receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am. J. Physiol.* (1999) 276, C1139-C1147.

DECHANET, J., MERVILLE, P., LIM, A., RETIERE, C., PITARD, V., LAFARGE, X., MICHELSON, S., MERIC, C., HALLET, M.-M., KOURILSKY, P., POTAU, L., BONNEVILLE, M. & MOREAU, J.-F. : Implication of gamma,delta T cells in the immune response to human cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* (1999) 103, 1437-1449.

FAURE, M., CALBO, S., KANELLOPOULOS, J., DRAPIER, A.-M., CAZENAVE, P.-A. & RUEFF-JUY, D. : Tolerance to maternal immunoglobulins : resilience of the specific T cell repertoire in spite of long-lasting perturbations. *J. Immunol.* (1999) 164, 6511-6519.

FERNANDEZ, N.C., LEVRAUD, J.-P., HADDADA, H., PERRICAUDET, M. & KOURILSKY, P. : High frequency of specific CD8+ T cells in the tumor and blood is associated with efficient local IL-12 gene therapy of cancer. *J. Immunol.* (1999) 162, 609-617.

GACHELIN, G., CAMBIAGGI, A. & LUESCHER, I.F. : Antigen recognition by lymphocytes. In : « *Encyclopaedia of Life Sciences* » (1999) MacMilland Ed. pp.

GERBER, D.J., AZUARA, V., LEVRAUD, J.-P., HUANG, S.Y., LEMBEZAT M.-P. & PEREIRA, P. : IL-4 producing gamma, delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J. Immunol.* (1999) 163, 3076-3082.

KESSLER, B., MICHIELIN, O., BLANCHARD, C.L., APOSTOLOU, I., DELARBRE, C., GACHELIN, G., GREGOIRE, C., MALISSEN, B., CEROTTINI, J.-C., WURM, F., KARPLUS, M. & LUESCHER, I.F. : T cell recognition of Hapten. *Anatomy of T cell receptor*

binding of a H-2Kd-associated photoreactive peptide derivative. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 3622-3631.

KUBOTA, A., LIAN, R.H., LOHWASSER, S., SALCEDO, M. & TAKEI, F.: IFN-gamma production and cytotoxicity of IL-2-activated murine NK cells are differentially regulated by MHC class I molecules. *J. Immunol.* (1999) 163, 6488-6493.

LAOUINI, D., PARDIGON, N. & KOURILSKY, P.: Report on the International Symposium on Vaccinology (November 18-20, 1999) Paris, France, organized by the Académie des Sciences and the Marcel Mérieux Foundation. *Microbes & Infection* (1999) 1, 361-365.

MASSAIA, M., BORRIONE, P., BATTAGLIO, S., MARIANI, S., BEGGIATO, E., NAPOLI, P., VOENA, C., BIANCHI, A., COSCIA, M., BESOSTRI, B., PEOLA, S., STIEFEL, T., EVEN, J., NOVERO, D., BOCCADORO, M. & PILERI, A.: Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune response after high-dose chemotherapy. *Blood* (1999) 94, 673-683.

MEMET, S., LAOUINI, D., EPINAT, J.-C., WHITESIDE, S.T., GOUDEAU, B., PHILPOTT, D., KAYAL, S., SANSONETTI, P.J., BERCHE, P., KANELLOPOULOS, J. & ISRAEL, A.: I κ B ϵ -deficient mice: reduction of one T cell precursor subspecies and enhanced Ig isotype switching and cytokine synthesis. *J. Immunol.* (1999) 163, 5994-6005.

MOERS, C., WARSKULAT, U., MÜSCHEN, M., EVEN, J., NIEDERACHER, D., JOSIEN, R., KOLDOVSKY, U., BECKMANN, M.W. & HAUSSINGER, D.: Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin. *Intern. J. Cancer* (1999) 80, 564-572.

MÜSCHEN, M., MOERS, C., WARSKULAT, U., NIEDERACHER, D., BETZ, B., EVEN, J., LIM, A., JOSIEN, R., BECKMANN, M.W. & HÄUSSINGER, D.: C95 ligand expression in dedifferentiated breast cancer. *J. Pathol.* (1999) 189, 378-386.

MÜSCHEN, M., WARSKULAT, U., PERNIOK., A., EVEN, J., MOERS, C., KISMET, B., TEMIZKAN, N., SIMON, D., SCHNEIDER, M. & HÄUSSINGER, D.: Involvement of soluble CD95 in Churg-Strauss syndrome. *Am. J. Pathol.* (1999) 155, 915-925.

MUSETTE, P., BACHELEZ, H., KOURILSKY, P., DUBERTRET, L. & GACHELIN, G.: What is the best way to define the anti-melanocyte T cell repertoire? *J. Invest. Dermatology* (1999) 113, 286-288.

MUSETTE, P., BACHELEZ, H., FLAGEUL, B., DELARBRE, C., KOURILSKY, P., DUBERTRET, L. & GACHELIN, G.: Immune-mediated destruction of melanocytes in halo nevi is associated with the local expansion of a limited number of T cell clones. *J. Immunol.* (1999) 162, 1789-1794.

PARDIGON, N. & LAOUINI, D.: New millenium. The need for new vaccines. *C.R. Acad. Sci, Paris, Sciences de la vie* (1999) 913-917.

SALCEDO, M.: Inhibitory role of murine Ly49 lectin-like receptors on natural killer cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.* (1999) 244, 97-105.

SCOTET, E., PEYRAT, M.-A., SAULQUIN, X., RETIERE, C., COUEDEL, C., DAVO-DEAU, F., DULPHY, N., TOUBERT, A., BIGNON, J.-D., LIM, A., VIE, H., HALLET, M.-M., LIBLAU, R., WEBER, M., BERTHELOT, J.-M., HOUSSAINT, E. & BONNEVILLE, M. : Frequent enrichment for CD8+ T cells reactive against common herpes viruses in chronic inflammatory lesions : towards a reassessment of the pathophysiological significance of T cell clonal expansions found in autoimmune inflammatory processes. *Eur. J. Immunol.* (1999) 29, 973-985.

SIVAKUMAR, P.V., GUNTURI, A., SALCEDO, M., SCHATZLE, J.D., LAI, W.C., KUREPA, Z., PITCHER, L., SEAMAN, M., BENNETT, M., FORMAN, J. & KUMAR, V. : Expression of functional CD94/NKG2A inhibitory receptors on fetal NK1.1+Ly49- cells. A possible mechanism of tolerance during Nkcell development. *J. Immunol.* (1999) 162, 6976-6980.

TOOMEY, J.A., SALCEDO, M., COTTERILL, L.A., MILLRAIN, M.M., CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z., LAWRY, J., FRASER, K., GAYS, F., ROBINSON, J.H., SHRESTHA, S., DYSON, P.J. & BROOKS, C.G. : Stochastic acquisition of Qa1 receptors during the development of fetal NK cells in vitro accounts in part but not in whole for the ability of these cells to distinguish between class I-sufficient and class I-deficient targets. *J. Immunol.* (1999) 163, 3176-3184.

WEIL, R., LEVRAUD, J.-P., DUC DODON, M., BESSIA, C., HAZAN, U., KOURILSKY, P. & ISRAEL, A. : Altered expression of tyrosine kinases of the Src and Syk families in human T-cell leukemia virus tatype 1-infected T-cell lines. *J. Virol.* (1999) 73, 3709-3717.

WILD, M.K., CAMBIAGGI, A., BROWN, M.H., DAVIES, E.A., OHNO, H., SAITO, T. & VAN DER MERWE, P.A. : Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* (1999) 190, 31-41.

2000

ARSTILA, T., ARSTILA, T.P., CALBO, S., SELZ, F., MALASSIS-SERIS, M., VASSALLI, P., KOURILSKY, P. & GUY-GRAND, D. : Identical T cell clones are located within the mouse gut epithelium and Lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. *J. Exp. Med.* (2000) 191, 823-834.

BONNET, M.-C., TARTAGLIA, J., VERDIER, F., KOURILSKY, P., LINDBERG, A., KLEIN, M. & MOINGEON, P. : Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunology Letters* (2000) 74, 11-25.

BOUSSO, P. : Generation of MHC-peptide tetramers : a new opportunity for dissecting immune T cell responses. *Microbes and Infection* (2000) 2, 425-429.

BOUSSO, P., LEMAITRE, F., BILSBOROUGH, J. & KOURILSKY, P. : Facing two T cell epitopes : a degree of randomness in the primary response is lost upon secondary immunization. *J. Immunol.* (2000) 165, 760-767.

BOUSSO, P., LEMAITRE, F., LAOUINI, D., KANELLOPOULOS, J. & KOURILSKY, P. : The peripheral CD8 T cell repertoire is largely independent of the presence of the intestinal flora. *International Immunology* (2000) 12, 425-430.

BOUSSO, P., WAHN, V., DOUAGI, I., HORNEFF, G., PANNETIER, C., LE DEIST, ZEPP, F., NIEHUES, T., KOURILSKY, P., FISCHER, A., DE SAINT-BASILE, G. : Diversity, functionality and stability of the T cell repertoire derived in vivo from a single human T cell precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (2000) 97, 274-278.

CALBO, S., GUICHARD, G., MULLER, S., KOURILSKY, P., BRIAND, J.-P., & ABASTADO, J.-P. : Antitumor vaccination using major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted pseudopeptides with reduced peptide bond. *J. Immunotherapy*. (2000) 23, 125-130.

CASROUGE, A., BEAUDOING, E., DALLE, S., PANNETIER, C., KANELLOPOULOS, J. & KOURILSKY, P. : Size estimate of the alpha/beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J. Immunol.* (2000) 164, 5782-5787.

CAVAZZA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT-BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J.-L., BOUSSO, P., LE DEIST, F. & FISCHER, A. : Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* (2000) 288, 669-672.

COLUCCI, F., GUY-GRAND, D., WILSON, A., TURNER, M., SCHWEIGHOFFER, E., TYBULEWICZ, V.L.J. & DI SANTO, J. : A new look at syk in alpha,beta and gamma,delta T cell development using chimeric mice with a low competitive hematopoietic environment. *J. Immunol.* (2000) 164, 5140-5145.

DELARBRE, C., ESCRIVA, H., GALLUT, C., BARRIEL, V., KOURILSKY, P., JANVIER, P., LAUDET, V. & GACHELIN, G. : The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the agnathan *Lampetra fluviatilis* : bearings on the phylogeny of cyclostomes. *Mol. Biol. Evol.*(2000) 17, 519-529.

FERRAND, C., ROBINET, E., CONTASSOT, E., CERTOUX, J.-M., LIM, A., HERVE, P. & TIBERGHEN, P. : Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes : influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Human Gene Therapy* (2000) 11, 1151-1164.

HAYMANN, J.P., LEVRAUD, J.-P., BOUET, S., KAPPES, V., HAGEGE, H., NGUYEN, G., RONDEAU, E. & SRAER, J.D. : Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* (2000) 11, 632-639.

HVID, L., AKANMORI, B.D., LOIZON, S., AL KURTZHALS, J., RICKE, C.H., LIM, A., KORAM, K.A., NKUMAH, F.K., MEERCEREAU-PUJALON, O. & BEHR, C. : High frequency of circulating gamma,delta T cells with dominance of the V.beta.1 subset in a healthy population. *International Immunology* (2000) 12, 797-805.

MICHAELSON, J., ACHOUR A., SALCEDO, M., KÄSE-SJÖSTRÖM, A., SUNDBÄCK, J., HARRIS, R.A. & KÄRRE, K. : Visualization of inhibitory Ly49 receptor specificity

with soluble major histocompatibility complex class I tetramers. *Eur. J. Immunol.* (2000) 30, 300-307.

MÜSCHEN, M., MOERS, C., WARSKULAT, U., EVEN, J., NIEDERACHER, D. & BECKMANN, M.W. : CD95 ligand expression as a mechanism of immune escape in breast cancer. *Immunology* (2000) 99, 69-77.

PARDIGON, N., CAMBOURIS, C., BERCOVICI, N., LEMAITRE, F., LIBLAU, R. & KOURILSKY, P. : Delayed and separate co-stimulation *in vitro* supports the evidence of a transient « excited » state of CD8⁺ T cells during activation. *J. Immunol.* (2000) 164, 4493-4499.

SMITH, H.R.C., CHUANG, H.H., WANG, L.L., SALCEDO, M., HEUSEL, J.W. & YOKOYAMA, W.M. : Nonstochastic coexpression of activation receptors on murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* (2000) 191, 1341-1354.

Manuscrits sous presse

BERNARD, K., CAMBIAGGI, A., GUIA, S., BERTUCCI, F., GRANJEAUD, S., TAGGET, R., N'GUYEN, C., JORDAN, B.R. & VIVIER, E. : Engagement of natural cytotoxicity programs regulates AP-1 expression in human NK cells. *J. Immunol.* (2000) sous presse.

CAMBIAGGI, A., LUCA, M., VELY, F. & VIVIER, E. : The enigma of activating isoforms ITIM-bearing molecules. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, sous presse.

CAMBIAGGI, A. & VIVIER, E. : Cellular aspects of lymphoid differentiation : T and NK cells. In : « Textbook of Malignant Haematology », Eds. L. Degos, D. Linch & B. Lowenberg — sous presse.

GACHELIN, G., CAMBIAGGI, A. & LUESCHER, I.F. : Antigen recognition by lymphocytes. In : « Encyclopaedia of Life Sciences » — Ed. Tylesheet, Copyright Macmillan Reference Ltd. — sous presse.

LAOUNI, D., CASROUGE, A., DALLE, S., LEMONNIER, F., KOURILSKY, P. & KANELLOPOULOS, J. : V.beta T cell repertoire of CD8⁺ splenocytes selected on non-polymorphic MHC class I molecules. *J. Immunol.* (2000) sous presse.

LIM, A., PEYRAT, M.A., DAVODEAU, F., TRAUTMANN, L., KOURILSKY, P. & BONNEVILLE, M. : Frequent contribution of T cell clonotypes with public T-cell receptor features to the chronic response against a dominant Epstein-Barr virus-derived epitope : application to direct detection of its molecular imprint on the human peripheral T cell repertoire. *J. Immunol.* (2000) sous presse.

MEMPEL, M., FLAGEUL, B., SUAREZ, F., RONET, C., DUBERTRET, L., KOURILSKY, P., GACHELIN, G. & MUSETTE, P. : Comparison of the T-cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas : presence of V.alpha.24-invariant NKT cells in T-cell reactive leprosy together with a highly biased TCR V.alpha. repertoire. *Am. J. Pathology* (2000) sous presse.

MUSETTE, P., EVEN, J., DUBERTRET, L., KOURILSKY, P. & GACHELIN, G. : The immunoscope analysis of the T lymphocytes infiltrating melanocytic tumors. In : « Methods in Molecular Medicine-Melanoma », Humana Press (2000) sous presse.

PERFETTINI, J.-L., DARVILLE, T., GACHELIN, G., SOUQUE, P., HUERRE, M., DAUTRY-VARSAT, A. & OJCIUS, D. : Apoptosis in the genital tract during infection with *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* (2000) sous presse.

REBOUL, M., NOUN, G., LACABANNE, V., ABASTADO, J.-P., KOURILSKY, P. & PLA, M. : Importance of a single amino acid substitution of the a helices of class I MHC molecules for the induction of a primary allogeneic response. In : « Allorecognition, tolerance and immunosuppression in transplantation » (1999) sous presse.

SALCEDO, M., COLUCCI, F., DYSON, P.J., COTTERILL, L.A., LEMONNIER, F.A., KOURILSKY, P., DI SANTO, J.P., LJUNGGREN, H.-G. & ABASTADO, J.-P. : Role of Qa-1b-binding receptors in the specificity of developing NK cells. *Eur. J. Immunol.* (2000) sous presse.

Autres publications

Ph. Kourilsky est, avec Madame G. Viney, l'auteur d'un rapport sur le « Principe de Précaution », rendu au Premier Ministre le 23 novembre 1999, et publié aux Éditions Odile Jacob/La Documentation Française en février 2000.

CONFÉRENCES DONNÉES SUR INVITATION PAR PH. KOURILSKY

- | | |
|------------------------------|---|
| 26-29 mars 1999 | Colloque BioVision, Lyon, France. |
| 17-18 septembre 1999 | Institut des Sciences du Vivant — « Nouvelle approche de l'agriculture » — Bordeaux |
| 1 ^{er} octobre 1999 | Montpellier — « La science en partage » |
| 6 juin 2000 | Eurocancer : « Immune tolerance and cancer ». |

De nombreux exposés et conférences ont été donnés sur le « Principe de Précaution », notamment devant la Commission Nationale de la Consommation (2 février 2000), divers clubs et associations, lors d'un colloque tenu à l'Assemblée Nationale (5 avril 2000), d'un colloque tenu au Collège de France et organisé par l'association « Passages » le 18 mai 2000 et d'un colloque de l'OCDE (27 juin 2000).