

---

# 12

## Bases moléculaires de la réponse immune

### Épitopes B

Des anticorps peuvent être induits contre les deux glycoprotéines de surface du virus de l'Influenza, l'hémagglutinine et la neuraminidase. Cependant, des anticorps à activité neutralisante ont été uniquement décrits contre l'hémagglutinine.

### Structure de l'hémagglutinine

L'hémagglutinine est constituée de deux types de chaînes (HA1 et HA2) organisées sous forme trimérique (Wilson et coll., 1981) (Figure 12-1). Ce trimère présente une structure de cylindre allongé de 135 Å de long et une section transversale triangulaire de 15 à 40 Å. L'hémagglutinine présente deux régions distinctes :

- une longue région fibreuse proche de la membrane cellulaire qui contient des résidus provenant à la fois de la chaîne HA1 et de la chaîne HA2, et structurée en alpha hélice à triple brins ;
- elle est surmontée d'une région globulaire contenant des résidus provenant uniquement de la chaîne HA1 ; cette région distale de la membrane cellulaire présente une structure de type bêta à 8 feuillets.

### Sites antigéniques B présents sur HA

Le nombre de sites antigéniques pour des anticorps a pu être déterminé à l'aide de sérums hyper-immuns et d'anticorps monoclonaux utilisés dans des tests de compétition par dosage radio-immunologique :

- 5 pour H1 de la souche A/PR8/8/34 (Gerhard et coll., 1981),
- 4 pour H3 de la souche A/Hong Kong/1/68 (Webster et Laver, 1980),
- 3 pour H3 de la souche A/Memphis/1/71 (Webster et Laver, 1980),
- 4 pour H3 de la souche A/Memphis/102/72 (Breschkin et coll., 1981).

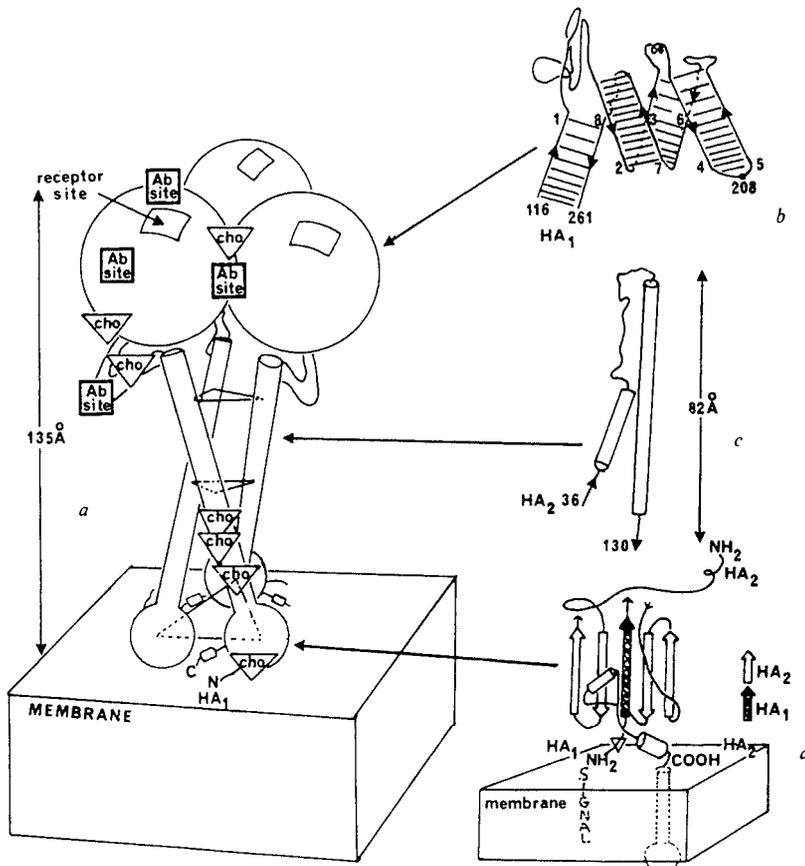


Figure 12-1 - Structure de l'hémagglutinine (d'après Wilson I.A. et coll., 1981)

Ces différents sites portent à la fois des spécificités de souches virales et des spécificités croisées (Wrigley et coll., 1977 - Russell et coll., 1979).

L'analyse tridimensionnelle de l'hémagglutinine de la souche A/Hong Kong/1/68, combinée à l'analyse des séquences en acides aminés de différentes hémagglutinines a permis de localiser 4 sites antigéniques à la surface de cette molécule (Wiley et coll., 1981) (Figure 12-2). Une substitution sur au moins un acide aminé de chacun de ces sites a été observée sur les souches responsables d'épidémie, suggérant que ces quatre mutations sont nécessaires pour qu'une nouvelle épidémie apparaisse.

- Site A : il représente le site majoritaire de fixation des anticorps. Il est situé au niveau de la boucle formée entre les acides aminés 140 et 146.

- Site B : il comprend les résidus externes 187-196 d'une alpha hélice et des résidus adjacents du bord supérieur de la poche qui constituerait le site de fixation du virus à son récepteur cellulaire.
- Site C : il est situé au niveau d'une protubérance créée par un pont disulfure entre les cystéines en position 52 et 277.
- Site D : il est situé au niveau des interfaces entre les différentes sous-unités et ne correspondrait pas à un site externe.

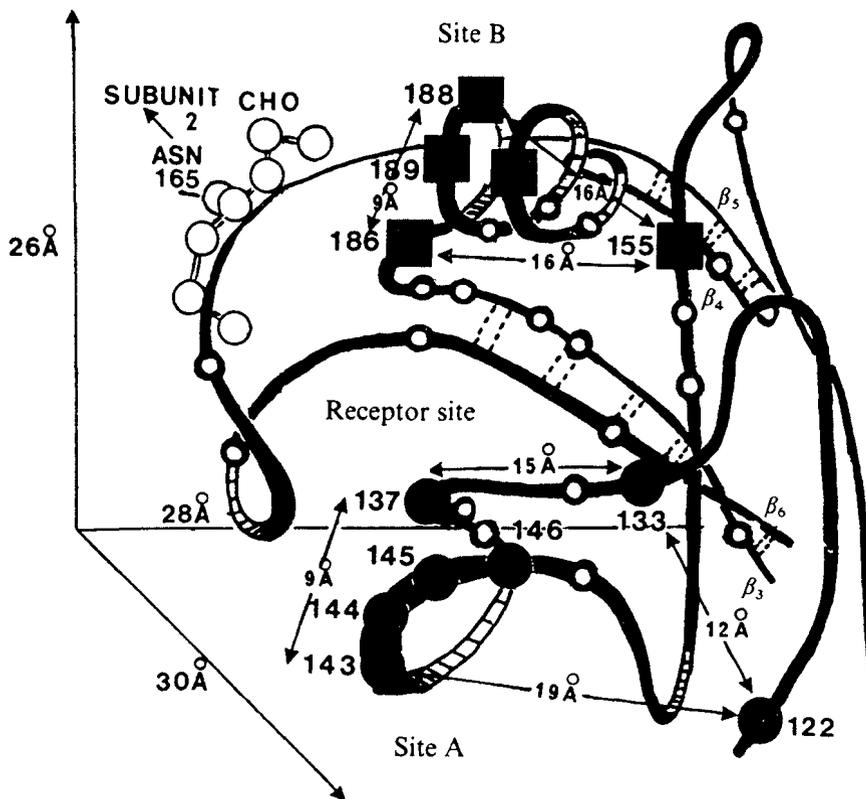


Figure 12-2 - Sites antigéniques - Anticorps. Site A : site majoritaire, boucle formée entre les résidus 140 et 146. Site B : résidus 187-196 d'une alpha hélice et résidus adjacents. Site C : protubérance créée par un pont disulfure entre les cystéine en position 52 et 277. Site D : interfaces entre les différentes sous-unités. (d'après Wiley D.C. et coll., 1981).

### Interaction antigène-anticorps

Elle a été étudiée par analyse aux rayons X après cristallisation et rapportée dans deux publications différentes concernant des épitopes B linéaires présents sur l'hémagglutinine ou sur la neuraminidase du virus Influenza.

Le groupe de Wilson (Rini et coll., 1992) a étudié un peptide correspondant à la séquence 100-108 de la chaîne HA1 située au niveau de l'interface de la molécule sous forme de trimère (site antigénique D). Cet épitope ne peut donc pas être reconnu à des pH physiologiques, mais seulement sur l'HA sous forme monomérique. L'interaction avec un anticorps monoclonal spécifique montre que le peptide se trouve sous forme d'un feuillet bêta de type I et interagit avec les boucles hypervariables L3, H2 et H3 de la partie Fab. Cette structure est également celle retrouvée sur la chaîne HA1 sous forme monomérique. La comparaison avec le Fab non lié à son peptide cible montre que la boucle H3 subit un réarrangement permettant l'apparition d'une poche de fixation pour la Tyr en position 105 du peptide.

L'équipe de Webster (Colman et coll., 1987) avait fait auparavant une étude similaire avec la neuraminidase (région 325-350) et avait conclu que la structure de l'antigène, ainsi que celle de l'anticorps subissaient des modifications au cours de la fixation.

## Épitopes CD4

### Réponse CD4 anti-influenza

Comme dans le cas de toute infection virale, la réponse T CD4 joue un rôle primordial dans les mécanismes de défense contre le virus de l'influenza. Les lymphocytes CD4 exercent en effet une fonction auxiliaire essentielle, par l'intermédiaire de lymphokines, d'une part sur les lymphocytes B permettant ainsi la sécrétion d'anticorps, et d'autre part sur les lymphocytes CD8 qui vont pouvoir se différencier en cellules cytotoxiques.

Par analogie à des travaux effectués chez la souris, il est suggéré chez l'homme l'existence de deux sous-populations fonctionnelles de cellules auxiliaires, en fonction du type de cytokines sécrétées, et pouvant donc induire des mécanismes immuns différents. Il serait donc particulièrement intéressant dans une optique vaccinale anti-influenza d'étudier ces différentes fonctions, et en particulier dans l'induction d'une réponse anticorps de type IgA qui a été rapportée comme jouant un rôle important dans les mécanismes de neutralisation dans les muqueuses respiratoires.

Le rôle *in vivo* des cellules CD4 dans le système influenza a été récemment montré dans un modèle de souris chez lesquelles le gène codant pour la bêta2 microglobuline a été inactivé. Ces souris n'expriment pas de molécules de classe I de CMH et ne développent donc pas de lymphocytes CD8. Elles sont pourtant protégées contre une infection létale par le virus de l'influenza. Cette protection peut être médiée par une réponse anticorps isolée, mais éventuellement aussi par des cellules CD4 exerçant une fonction cytotoxique, effecteurs cellulaires qui ont été retrouvés chez ces

souris, alors qu'elles ne sont pas mises en évidence chez des souris normales (Braciale et Katz, cités dans Askonas, 1993). Ces cellules CD4 + présentant une fonction cytotoxique ne sont pas retrouvées non plus chez l'homme par des techniques de dilution limite effectuées à partir des cellules du sang périphérique, mais seulement après de nombreuses stimulations *in vitro*, suggérant qu'elles ne doivent pas exercer un rôle majoritaire *in vivo* (Bourgault et coll., 1989).

### Mécanismes de présentation

Les lymphocytes CD4 reconnaissent leur antigène cible sous forme d'un peptide (de 13 à 17 acides aminés de long) associé à une molécule de classe II du CMH. Les chaînes alpha et bêta des molécules de classe II sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où elles s'associent à la chaîne invariante qui s'y trouve en excès. Après passage dans l'appareil de Golgi, elles quittent la voie classique de sécrétion et, après une dégradation de la chaîne invariante, elles s'accumulent dans des vésicules pré-lysosomales possédant certaines caractéristiques des endosomes tardifs. C'est dans ce compartiment qu'elles vont pouvoir fixer des peptides issus de la dégradation de protéines exogènes dans les endosomes.

Ce processus classique a surtout été mis en évidence dans le système influenza (Morrison et coll., 1986 - Fleischer et coll., 1985). Cependant, il existe des exceptions à ce schéma, comme cela a été suggéré par deux types de travaux.

- Après infection d'une lignée lymphoblastoïde B par du virus entier et l'utilisation de drogues comme, d'une part la chloroquine, et d'autre part la brefeldine A, on observe des résultats qui suggèrent que des antigènes de la matrice peuvent être également présentés à des cellules CD4, classe II restreintes, après un passage dans le compartiment pré-golgien (Nuchter et coll., 1990).

- Après introduction artificielle de protéines exogènes, en utilisant le virus de la vaccine comme vecteur de la matrice, ou par fusion de particules virales non infectieuses (neuraminidase), une présentation de peptides associés à des molécules de classe II est possible. Elle serait indépendante des transporteurs de peptides s'associant aux molécules de CMH de classe I, mais dépendrait d'un gène codé dans la région impliquée dans la synthèse des molécules de classe II (Maltani et coll., 1993).

Il est évident que pour un antigène et un haplotype de CMH donnés, un petit nombre seulement de tous les peptides possibles de l'antigène est effectivement présentable. La détermination de séquence consensus spécifique d'une molécule de classe II déterminée pourrait aider à l'identification des épitopes CD4. Cependant, la grande hétérogénéité de longueur des peptides s'associant aux molécules de classe II complique l'identification des consensus.

Un défaut d'activation des cellules CD4 peut être obtenu par différents mécanismes :

- des mutations apparaissant dans ces peptides peuvent perturber la capacité de ce peptide à se fixer à une molécule de classe II déterminée, comme cela a été montré pour certains épitopes CD4 de l'hémagglutinine présentés par la molécule I-Ak (Warren et coll., 1990) ;
- l'utilisation de peptides antagonistes plus affins pour le récepteur de la cellule T entraîne un défaut d'activation de la cellule T, comme c'est montré pour le peptide 307-319 de HA reconnu en association avec HLA-DR1 (Ruppert et coll., 1993).

### Identification des épitopes CD4

Pratiquement toutes les protéines du virus de l'influenza ont été décrites comme pouvant être antigéniques pour des lymphocytes CD4. La détermination systématique des épitopes CD4 a été réalisée, essentiellement pour l'hémagglutinine et la nucléoprotéine, par des tests de prolifération vis-à-vis de peptides synthétiques. Ces études ont été réalisées après infection naturelle ou après vaccination.

#### CHEZ LA SOURIS

Un travail du groupe de Graham (Thomas et coll., 1993) à partir de souris Balb/c (H-2<sup>d</sup>) et CBA (H-2<sup>k</sup>) infectées par le virus A/X31 montre que la grande majorité de ces épitopes sur H3 est localisée, comme pour les épitopes B, sur la partie distale de la sous-unité HA1 :

- 58-73, 81-97, 177-199, 186-200 et 206-227 avec I-Ad
- 54-63, 68-83, 118-138, 226-254 et 246-266 avec I-Ak

La co-localisation d'épitopes B et CD4 dans une même séquence peptidique est évidemment intéressante dans une optique vaccinale ; cependant, il est important de noter que ces épitopes CD4, comme les épitopes B, présentent des séquences variables selon différentes souches virales. Il a été montré par exemple qu'une seule mutation portant sur l'acide aminé 135 abolissait la reconnaissance de la région correspondante, aussi bien par des anticorps que par des cellules CD4 (Thomas et coll., 1987).

Des épitopes CD4 de la nucléoprotéine ont également été identifiés chez la souris Balb/c ; ils sont similaires après infection par du virus entier ou après immunisation par de la protéine recombinante (Brett et coll., 1991).

#### CHEZ L'HOMME

Deux publications (Brett et coll., 1991 - Rodda et coll., 1993) rapportent l'existence dans la nucléoprotéine de deux régions immunodominantes correspondant aux séquences 217-262 et 341-362. Des épitopes CD4 peuvent aussi être retrouvés sur toute la séquence de cette protéine, excepté dans la région 424-466. Cette observation suggère que des épitopes CD4

peuvent être retrouvés pratiquement sur toute la séquence de cette protéine ; mais il est fortement probable que chacune de ces régions est reconnue par des individus différents en association avec des molécules de classe II différentes.

Il ne semble pas en être de même pour l'hémagglutinine qui présente des épitopes CD4 localisés uniquement dans certaines régions qui, de plus, ne sont pas les mêmes pour H1 et H3, reflétant très probablement la plus grande variabilité de séquence de cette protéine.

Des études fragmentaires concernant les molécules de classe II humaines présentatrices ont permis de montrer par exemple que la molécule HLA-DR1 pouvait présenter le peptide 307-319 de l'hémagglutinine (Lamb et coll., 1983), ou le peptide 17-31 de la matrice (Shimojo et coll., 1989).

## Épitopes CD8

### Réponse CD8 anti-influenza

La réponse cytotoxique joue un rôle essentiel dans le système influenza. En effet, la réponse anticorps, dirigée contre des déterminants variables de l'hémagglutinine, ne peut suffire à protéger contre une nouvelle épidémie ou pandémie.

Les caractéristiques essentielles de la réponse CTL à l'origine de cette efficacité sont sa précocité qui permet d'éliminer les premières cellules infectées et sa capacité à reconnaître des épitopes conservés, en particulier présents sur la nucléoprotéine. Les lymphocytes CD8 exercent une fonction cytotoxique, mais peuvent aussi inhiber directement la réplication virale, en particulier par l'intermédiaire d'interféron gamma (Di Fabio et coll., 1993).

De nombreuses approches expérimentales ont permis de montrer chez la souris le rôle protecteur *in vivo* de ces CTL, en particulier des transferts de CTL CD8 et des immunisations par des protocoles n'induisant qu'une réponse CTL. Chez l'homme, des individus qui avaient reçu volontairement du virus infectieux par voie nasale ont montré une capacité à éliminer le virus corrélée à la réponse CTL, même en l'absence d'une réponse anticorps spécifique (McMichael et coll., 1983).

La réponse CTL peut aussi avoir un rôle néfaste, surtout si elle est très intense, par destruction de certaines cellules infectées. Il semble cependant établi que la pathologie ainsi induite est transitoire, et que les cellules CD8 sont particulièrement efficaces pour accélérer l'élimination du virus des poumons et de la trachée (pour revues, voir Kelkar, 1988 et Askonas, 1993).

## Mécanismes de dégradation peptidique

Les lymphocytes CD8 reconnaissent leur antigène cible sous forme d'un peptide (de 8 à 10 acides aminés de long) associé à une molécule de classe I du CMH. Ces molécules de classe I, comme celles de classe II, sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où les chaînes lourdes vont s'associer à la bêta2microglobuline en excès. Contrairement à ce qui se passe pour les molécules de classe II, c'est dans le réticulum endoplasmique que des complexes moléculaires chaîne lourde/bêta2-m vont fixer des peptides issus de la dégradation de protéines endogènes.

Il est très probable que ces peptides ne soient pas produits dans le réticulum endoplasmique, mais dérivent du cytosol, les différents arguments ayant été apportés tout particulièrement dans le système influenza (introduction artificielle de protéines exogènes dans le cytosol, utilisation de gène codant pour l'hémagglutinine et délété du peptide signal).

La dégradation en peptides des protéines cytosoliques se fait dans un premier temps par des protéases et l'ubiquitine, ce qui permettrait essentiellement d'éliminer les protéines possédant une mauvaise conformation ou résultant d'un arrêt prématuré de traduction. Le découpage spécifique en peptides destinés aux molécules de classe I se ferait par une classe particulière des complexes catalytiques appelés protéasome et dont certaines sous-unités (LMP1 et LMP7) sont codées par des gènes situés dans le CMH.

Les peptides produits dans le cytosol doivent ensuite être transportés vers la lumière du réticulum endoplasmique à l'aide de transporteurs spécialisés (comme Tap1 et Tap2) qui ont pu être mis en évidence grâce à des cellules mutées au niveau des gènes correspondants (Cerundolo et coll., 1990).

Il est évident que la connaissance de ces mécanismes de dégradation d'antigènes à des cellules CD8 est essentielle car elle permet de comprendre que des CTL peuvent facilement être induits *in vivo* par le virus entier, mais que, dans une optique vaccinale, les approches utilisées pour l'immunisation doivent nécessairement impliquer une synthèse endogène des protéines virales, ou leur introduction artificielle dans le cytosol.

Cependant, deux groupes ont rapporté la possibilité d'induire une réponse CTL spécifique de l'influenza après immunisation avec du virus inactivé (Greenberg et coll., 1978 - Ennis et coll., 1982). Il est possible de supposer que la vaccination a, en fait, agit indirectement par l'intermédiaire d'une stimulation des cellules auxiliaires CD4 permettant une réactivation *in vivo* de cellules CD8 « mémoire », puisque, dans ce système viral, les individus immunisés ont de toute évidence été déjà en contact avec le virus lors d'infections naturelles.

## Mécanismes de fixation des peptides aux molécules de classe I

La fixation du peptide au complexe chaîne lourde/ $\beta$ 2-m dans le réticulum induit une conformation stable de l'ensemble qui autorise le transport de la molécule vers la surface de la cellule par la voie classique de sécrétion par l'intermédiaire des vésicules d'exocytose (Cox et coll., 1990 - Kvist et coll., 1990 - Dornmair et coll., 1991). Les principaux peptides présents dans les molécules HLA de classe I sont désormais caractérisables après élution acide et séquençage (Rammensee et coll., 1993). Par exemple, la molécule HLA-B27 contient exclusivement des peptides sous forme nonamérique avec un motif structural unique, la présence d'un acide aminé particulier définissant le point d'ancrage principal avec la molécule HLA (Arg en position 2). En revanche, les peptides issus des molécules HLA-A68 ont une taille variable de 8 à 11 acides aminés ; mais la position 2 est conservée (Val ou Thr), ainsi que leurs extrémités (Silver et coll., 1992, Guo et coll., 1992). En résumé, les peptides fixés aux molécules HLA sont caractérisés à leurs extrémités N et C par des résidus chargés et comportent deux points d'ancrage (P2 et PC), alors qu'une variabilité du nombre d'acides aminés est possible entre les deux points d'ancrage du peptide.

L'accumulation des séquences des peptides élués et des peptides antigéniques a donc permis, dans certains cas, de dégager des motifs communs qui permettent de prédire la localisation d'épitopes T sur une protéine. Il est cependant important de noter que ces consensus peuvent rester flous ; que quelques peptides, connus pour être immunologiquement actifs, échappent aux consensus déterminés jusqu'à présent, et, inversement, que des peptides présentant ces consensus peuvent ne pas correspondre à des épitopes naturellement dégradés par la cellule infectée, même s'ils montrent *in vivo* une très grande affinité pour la molécule de classe I correspondante.

La sélection de peptides de synthèse est une approche actuellement très utilisée pour identifier de nouveaux épitopes CD8. Une autre approche possible est l'utilisation de fragments peptidiques issus de la digestion alcaline de la protéine d'intérêt produite par l'intermédiaire d'un vecteur, comme cela a été récemment démontré par l'utilisation de *Escherichia Coli* produisant des protéines du cytomégalovirus humain (Gavin et coll., 1993).

## Reconnaissance par le récepteur de la cellule T

Il est maintenant bien établi que le TcR du lymphocyte CD8 reconnaît un complexe moléculaire formé de la molécule de classe I et du peptide antigénique. Il n'a cependant pas été déterminé de façon définitive si ce TcR reconnaît uniquement des acides aminés du peptide ou uniquement des acides aminés de la molécule de classe I ou, plus vraisemblablement, un ensemble de ses résidus.

Dans le système influenza, deux publications ont rapporté que différents clones cellulaires reconnaissant la même association, molécule de classe I/peptide, utilisaient préférentiellement des chaînes V alpha ou V bêta portant les mêmes marqueurs idiotypiques (Bownes et coll., 1993 - Moss et coll., 1991). Cette observation est importante dans une optique vaccinale car elle permettrait de juger de l'efficacité de la vaccination concernant les cellules CD8 par le repérage de tels marqueurs.

### **Identification des épitopes CD8**

#### PROTÉINES RECONNUES

L'antigénicité de chacune des protéines du virus de l'influenza a pu être établie en utilisant, dans des tests de cytolysse, des cellules cibles infectées soit par des souches virales de sous-types différents, naturelles ou recombinantes, soit par des virus de la vaccine dont le génome a été recombiné avec le gène codant pour une protéine déterminée du virus de l'influenza.

La nucléoprotéine apparaît comme la cible majeure de la réponse CTL chez l'homme, mais les autres protéines internes, en particulier la matrice, peuvent aussi être reconnues. Les CTL spécifiques de ces protéines internes présentent une réactivité croisée entre les différentes souches virales de type A ; en revanche, aucune réactivité croisée n'est retrouvée avec les virus de type B. Des réponses CTL dirigées contre l'hémagglutinine n'ont été détectées que chez la souris. Cette différence d'antigénicité est probablement due au fait que la souris est toujours immunisée par l'expérimentateur à l'aide de la même souche (de souris), permettant ainsi la reconnaissance d'épitopes variables présents sur l'hémagglutinine. En revanche, chez l'homme, l'immunisation est réalisée par des infections naturelles par des souches virales se modifiant chaque année, ce qui favorise la sélection de CTL « mémoire » capables de reconnaître essentiellement les épitopes conservés présents sur les protéines internes du virus (pour revues, voir Kelkar, 1988 et Askonas, 1993).

#### ÉPITOPES CD8 MURINS CONNUS

Ils ont pu être identifiés, comme pour les épitopes CD4, à l'aide de peptides synthétiques utilisés pour sensibiliser des cellules cibles dans des tests de cytolysse. Ils sont situés :

- sur l'hémagglutinine : HAI 202-212 avec H2-Kd (Sweetser et coll., 1989) HAI 212-221 avec H2-Kd (Sweetser et coll., 1989) HAI 259-266 avec H2-Kk (Gould et coll., 1991) HAI 508-530 avec H2-Kd (Sweetser et coll., 1989) HAI 523-545 avec H2-Kd (Sweetser et coll., 1989) HA2 10-18 avec H2-Kk (Gould et coll., 1991) ;

- sur la nucléoprotéine : NP 50-63 avec H2-Kk (Bastin et coll., 1987) NP 147-158 avec H2-Kd (Bodmer et coll., 1988) Np 366-374 avec H2-Db (Zhou et coll., 1993).

## ÉPITOPES CD8 HUMAINS CONNUS

Ils ont pu jusqu'à ce jour être définis

- sur la nucléoprotéine : NP 91-99 avec HLA-B8 (Silver et coll., 1992) NP 335-349 avec HLA-B37 (Townsend et coll., 1986), NP 380-388 avec HLA-B8 (Sutton et coll., 1993), NP 383-391 avec HLA-B27 (Huet et coll., 1990) ;
- sur la matrice M 58 66 avec HLA-A2 (Bednarek et coll., 1991).

## BIBLIOGRAPHIE

- ASKONAS BA. Immunology : T cells in influenza. In : C. Hannoun et coll. (Eds.) *Options for the control of influenza II*. 1993. 259.
- BEDNAREK MA, SAUMA SY, GAMMON MC, PORTER G, TAMHANKAR S, WILLIAMSON AR, ZWEERINK HJ. The minimum peptide epitope from the Influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol*. 1991. **147**. 4047.
- BOURGAULT I, GOMEZ A, GOMARD E, PICARD F, LÉVY JP. A virus-specific CD4 cell-mediated cytolytic activity revealed by CD8 cell elimination regularly develops in uncloned human antiviral cell lines. *J Immunol*. 1989. **142**. 252.
- BOWNES P, MOSS PAH, ROWLAND-JONES S, BELL JI, MCMICHAEL AJ. Conservation of T cell receptor usage by HLA B27-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocytes suggest a general pattern for antigen-specific major histocompatibility complex class I-restricted responses. *Eur J Immunol*. 1993. **23**. 1417.
- BRESCHKIN AM, AHERN J, WHITE DO. Antigenic determinants of Influenza virus hemagglutinin. *Virology*. 1981. **113**. 130.
- BRETT SJ, GAO XM, LIEW FY, TITE JP. Selection of the same major T cell determinants of influenza nucleoprotein after vaccination or exposure to infectious virus. *J Immunol*. 1991. **147**. 1647.
- BRETT SJ, HUGHES-JENKINS CM, RHODES J, LIEW FY, TITE JP. Human T cell recognition of influenza A nucleoprotein specificity and genetic restriction of immunodominant T helper cell epitopes. *J Immunol*. 1991. **147**. 984-991.
- CERUNDOLO V, ALEXANDER J, ANDERSON K, LANM C, CRESSWELL P, MCMICHAEL A, GOTCH F, TOWNSEND A. Presentation of viral antigen controlled by a gene in the major histocompatibility complex. *Nature*. 1990. **345**. 449.
- COLMAN PM, LAVER WG, VARGHESE JN, BAKER AT, TULLOCH PA, AIR GM, WEBSTER RG. Three-dimensional structures of a complex of antibody with Influenza virus neuraminidase. *Nature*. 1987. **326**. 358.
- COX JH, YEWDELL JW, EISENLOHR LC, JONHSON PR, BENNINK JR. Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum. *Science*. 1990. **247**. 715.
- COX N, XU X, BENDER C, KENDAL A, REGNERY H, HEMPHILL M, ROTA P. *Options for the control of influenza II*. C Hannoun et coll. (eds). 1993. 223.

DI FABIO S, MBAWUIKE IN, KIYONO H, FUJISHI K, COUCH RB, MCGHEE JR. Quantification of human Influenza virus-specific cytotoxic T lymphocytes : correlation of cytotoxic and increased numbers of IFN-gamma producing CD8 + T cells. *Int Immunol.* 1993. **6**. 11.

DORNMAIR K, CLARCK BR, MCCONNELL HM. In vitro peptide binding to the heavy chain of the class I molecule of the major histocompatibility complex molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1991. **88**. 1335.

ENNIS FA, YI-HUA Q, SCHILD GC. Antibody and cytotoxic T lymphocytes responses of humans to live and inactivated influenza vaccines. *J Gen Virol.* 1982. **58**. 273.

FLEISCHER B, BECHT H, ROTT R. Recognition of viral antigens by human influenza A virus-specific T lymphocyte clones. *J Immunol.* 1985. **135**. 2800-2804.

GAVIN MA, GILBERT MJ, RIDELL SR, GREENBERG PD, BEVAN MJ. Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC restricted CTL epitopes. *J Immunol.* 1993. **151**. 3971.

GERHARD W, YEWDELL J, FRANKEL ME, WEBSTER R. Antigenic structure of Influenza virus haemagglutinin defined by hybridoma antibodies. *Nature.* 1981. **290**. 713.

GREENBERG SB, CRISWELL BS, SIX HR, COUCH RB. Lymphocyte cytotoxicity to Influenza virus infected cells : response to vaccination and virus infection. *Infect Immun.* 1978. **20**. 640.

GUO HC, JARDETZKY TA, GARRETT TPJ, LANE WS, STROMINGER JL, WILEY DC. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature.* 1992. **360**. 364.

HUET S, NIXON DF, ROTHBARD JB, TOWNSEND A, ELLIS SA, MCMICHAEL AJ. Structural homologies between two HLA B27-restricted peptides suggest residues important for interaction with HLA-B27. *Int Immunol.* 1990. **2**. 311.

KELKAR SD. Importance of cytotoxic T lymphocytes in influenza vaccine research. *Current Science.* 1988. **57**. 655.

KVIST SD, HAMANN UA. Nucleoprotein peptide of Influenza A virus stimulates assembly of HLA-B27 class I heavy chains and beta2-microglobulin translated in vitro. *Nature.* 1990. **348**. 446.

LAMB JR, GREEN N. Analysis of the antigen specificity of influenza haemagglutinin-immune human T lymphocyte clones : identification of an immunodominant region for T cells. *Immunology.* 1983. **50** (4). 659-666.

MALTANI MS, CEMAN S, WESTON M, DEMARS R, LONG E. Presentation of cytosolic antigen by HLA-DR requires a function encoded in the class II region of the MHC. *J Immunol.* 1993. **151**. 6751.

MCMICHAEL AJ, GOTCH FM, NOBLE GR, BEARE AS. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med.* 1983. **309**. 13.

MORRISON LA, LUKACHER AE, BRACIALE VI, FAN DP, BRACIALE TJ. Differences in antigen presentation to MHC class I - and class II - restricted cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med.* 1986. **163**. 903-921.

MOSS PAH, MOOTS RJ, ROSENBERG WMC, ROWLAND-JONES SJ, BODMER HC, MCMICHAEL AJ, BELL JL. Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 1991. **88**. 8987.

- NUCHTERN JG, BIDDISON WE, KLAUSNER RD. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature*. 1990. **343**. 74.
- RAMMENSEE HG, FALK K, ROTZSHKE O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Ann Rev Immunol*. 1993. **11**. 213.
- RINI JM, SCHULZE-GAHRNEN U, WILSON IA. Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody- antigen recognition. *Science*. 1992. **255**. 959.
- RODDA SJ, BENSTEAD M, GEYSEN HM. Exhaustive helper T cell determinant mapping of influenza type A antigens with synthetic peptides and human peripheral blood mononuclear cells. In : C. Hannoun et coll. (eds). *Options for the control of influenza II*. 1993. 237.
- RUPPERT J, ALEXANDER J, SNOKE K, COGGESHALL M, HERBERT E, MCKENZIE D, GREY HM, SETTE A. Effect of T-cell receptor antagonism on interaction between T cells and antigen-presenting cells and on T-cell signaling events. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1993. **90**. 2671-2675.
- RUSSEL RJ, BURNS WH, WHITE DO, ANDERS EM, WARD CW, JACKSON DC. Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. III. Competitive binding of antibodies directed against common and strain-specific antigenic determinants of A/Memphis/72 hemagglutinin. *J Immunol*. 1979. **123**, 825.
- SHIMOJO N, MALOY WL, ANDERSON RW, BIDDISON RW, COLIGAN WE. Specificity of peptide binding by the HLA-A2. 1 molecule. *J Immunol*. 1989. **143**. 2939-2347.
- SILVER ML, GUO HC, STROMINGER JL, WILEY DC. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza peptide. *Nature*. 1992. **360**. 367.
- SUTTON J, ROWLAND-JONES S, ROSENBERG W, NIXON D, GOTCH F, GAO XM, MURRAY N, SPOONAS A, DRISCOLL P, SMITH M. A sequence pattern for peptides presented to cytotoxic T lymphocytes by HLA-B8 revealed by analysis of epitopes and eluted peptides. *Eur J Immunol*. 1993. **23**. 447.
- THOMAS DB, SKEHEL JJ, MILLS KHG, GRAHAM CMA. Single amino acid substitution in influenza hemagglutinin abrogates recognition by monoclonal antibody and a spectrum of subtype-specific L3T4 T cell clones. *Eur J Immunol*. 1987. **17**. 133.
- THOMAS DB, SMITH CA, BARNETT BA, GRAHAM CM. In : C. Hannoun et coll. (eds.) *Options for the control of influenza II*. 1993. 251.
- TOWNSEND ARM, TOTHBARD J, GOTCH FM, BAHADUR G, WRAITH D, MCMICHAEL AJ. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. 1986. **44**. 959.
- WARREN AP, PASCHEDAG I, BENOIST C, PECCOUD J, MATHIS D, THOMAS DB. Defects in antigen presentation of mutant influenza haemagglutinins are reversed by mutations in the MHC class II molecule. *EMBO J*. 1990. **9**. 3849.
- WEBSTER RG, LAVER WG. Determination of the number of non-overlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) Influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology*. 1980. **104**. 139.
- WILEY DC, WILSON LA, SKEHEL JJ. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*. 1981. **289**. 373.

WILSON IA, SKEHEL JJ, AND WILEY DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza at 3 Å resolution. *Nature*. 1981. **289**. 366.

WRIGLEY NG, LAVER WG, DOWNIE JC. Binding of antibodies to isolated hemagglutinin and neuraminidase molecules of Influenza virus observed in the electron microscope. *J Mol Biol*. 1977. **109**. 405.