

50376
1991
282

6785

50376
1991
282

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° d'ordre 806



THESE

Présentée à l'Université de Lille I pour obtenir

le grade de Docteur

par

Hervé GROUX

*

Régulation de l'activation des lymphocytes T: de la prolifération à la mort cellulaire par apoptose.

Application à l'étude physiopathologique du SIDA.

*

devant la Commission d'Examen

Président:	Pr. M. PORCHET
Rapporteurs	Pr. A. BERNARD Dr. F. ARENZANA-SEISDEDOS
Examineurs	Pr. A. CAPRON Pr. J.P. DESSAINT Dr. J.C. AMEISEN

Le 15 NOVEMBRE 1991

A Emmanuelle et Alice,

A ma famille,

A mes amis.

Je tiens à remercier très vivement :

Monsieur le Professeur André Capron,
qui m'a accueilli, conseillé et suivi avec une grande bienveillance. Que ce mémoire soit le témoignage de mon admiration et de ma gratitude

Monsieur le Professeur Alain Bernard
qui a initié ce travail et l'a accompagné de son enthousiasme et de son dynamisme. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon plus grand respect.

Monsieur le Docteur Jean-Claude
Ameisen pour son enthousiasme et sa disponibilité, et pour les moments d'enthousiasmes
partagés

Monsieur le Docteur Fernando
Arenzana-Seisdedos pour avoir accepté de juger l'ensemble de ce travail.

Monsieur le Professeur Jean-Paul
Dessaint pour m'avoir fait l'honneur de participer à la constitution de mon jury, veuillez
accepter mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Maurice Porchet
pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez accepter mes
sincères remerciements.

Ce travail a été réalisé

au laboratoire d'Immunologie des Tumeurs de l'Enfant de l'Institut Gustave Roussy à Villejuif, sous la direction du Pr. Alain Bernard.

ainsi qu'au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité mixte INSERM U1647- CNRS 624) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Pr. André Capron et dans le groupe du Dr. Jean-Claude Ameisen.

Je tiens à dire un grand merci à tous ceux qui m'ont aidé

et notamment Stéphane, Hélène et Catherine à
Villejuif

ainsi que Didier, Fanfan, Claude et tous les
membres du groupe IRRI, Bénédicte et tous les membres du
groupe HIV à Lille

Ce travail a donné lieu aux publications suivantes:

- 1) GROUX H., HUET S., VALENTIN H., PHAM D. and BERNARD A. Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by CD29 molecule of CD4 lymphocytes. *Nature*, -1989-1. 339, 152-154.
- 2) GROUX H., HUET S., AUBRIT F., TRAN H.C., BOUMSELL L. and BERNARD A. A 19 kDa human erythrocyte molecule is involved in rosettes, present on nucleated cells and required for T cell activation. *J. Immunol.*, -1989-2. 142, 3013-3020.
- 3) HUET S., GROUX H., CAILLOU B., VALENTIN H., PRIEUR A.M. and BERNARD A. CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.*, -1989-3. 143, 798-801.
- 4) GROUX H., MONTE D., BOURREZ J.M., CAPRON A. and AMEISEN J.C. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ de sujets asymptomatiques infectés par le VIH entraîne le déclenchement d'un programme de mort lymphocytaire par apoptose. *C. R. Acad. Sci. Paris* -1991-1. t. 312, Serie III p. 599-606.
- 5) GROUX H., TORPIER G., MONTE D., MOUTON Y., CAPRON A. and AMEISEN J.C. Activation-induced death by apoptosis of CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals. *J. Exp. Med.* -1991-2. (in press)
- 6) GROUX H., MONTE D., PLOUVIER B., CAPRON A. and AMEISEN J.C. A general mechanism for the induction of cell death by apoptosis in T cells at different stage of maturation or activation. Respective roles of IL2 and IFN γ . *J. Exp. Med.* -1991-3. (submitted)

présentation à des congrès

1) GROUX H., TORPIER G., MONTE D., BOURREZ J.M., CAPRON A. and AMEISEN J.C.- 1991- TCR mobilization of CD4 T cells from HIV-infected asymptomatic individuals results in activation-induced death by apoptosis. E. N. I. I. conference May 28-june1,1991. Les Embiez, France.

2) AMEISEN J.C., GROUX H., TORPIER G., MOUTON Y. and CAPRON A.-1991- Programmed T cell death (apoptosis) and AIDS pathogenesis. Track A, Basic science. Abstract vol. II. VII int. Conference AIDS. Florence. 16-28 June 1991.

Autres travaux

1) GROUX H. -1988- Etude du rôle du récepteur du homing dans l'activation des lymphocytes T. Thèse vétérinaire. Université Paul Sabatier TOULOUSE.

2) VALENTIN H., GROUX H., GELIN C., CHRETIEN I. and BERNARD A. Modulation of lymphokine release and cytolytic activities by activating peripheral blood lymphocytes via CD2. *J. Immunol.* -1990-1. 144, 875-882.

3) GROUX H., PERRAUT R., GARRAUD O., POINGT J.P. and GYSIN J. Functional characterization of the antibody mediated protection against blood stages of *Plasmodium falciparum* in the *Saimiri sciureus* monkey. *Eur. J. Immunol.*, -1990-2. 10, 2317-2323.

4) GROUX H. and GYSIN J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* : functional role of IgG subclasses. *Res. in Immunol.*, -1990-3. 141, 529-542.

5) GARRAUD O., GROUX H., POINGT J.P. and GYSIN J. Limited MHC-class II polymorphism within squirrel monkeys of the same karyotype. *Med. Sci. Res.*, -1990-4. 18, 359-361.

6) MONTE D., GROUX H., RAHARINIVO B., PLOUVIER B., CLAVEL T., GRANGETTE C., TORPIER G., AURIAULT C., CAPRON A. & AMEISEN J.C. Productive HIV-1 infection of megacaryocytic cells is enhanced by tumor necrosis factor. *Blood.* -1991-4. (submitted).

GROUX H. and GYSIN J.-1990- Opsonization as an effector mechanism in protection against asexual blood stages of Plasmodium falciparum. ICOPA VII Paris, 20-24 August 1990.s

GARRAUD O., GROUX H. and GYSIN J.-1991- Activation cellulaire et paludisme experimental chez le Saimiri. ICOPA VII Paris, 20-24 August 1990.s

PLAN

Résumé de l'ensemble des travaux.

A] Activation des lymphocytes T

- 1. Le récepteur T
- 2. Les cellules présentatrices de l'antigène.
- 3. Le complexe CD3
- 4. Les différentes molécules participant à l'activation des lymphocytes T

B] La molécule CD2 et ses différents ligands, rôles dans l'activation des lymphocytes T.

- 1 Mise en évidence de la molécule CD2
- 2. Rôle fonctionnel de la molécule CD2
- 3. Inter-relations entre les voies d'activation CD3 et CD2.
- 4 Les ligands de la molécule CD2
 - 4.1. La molécule T11TS
 - 4.2. La molécule LFA-3.
 - 4.3. Les autres ligands de la molécule CD2
- 5. La molécule H19 (CD59) : une molécule présente à la surface des leucocytes, impliquée dans le phénomène des rosettes et nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Un deuxième ligand pour la molécule CD2 ?
 - 5.1. Résumé de l'article 1
 - 5.2. La molécule H19 est un deuxième ligand pour CD2.
 - 5.3. Les autre rôle de la molécule H19
 - 5.4. Structure de la molécule H19

C] CD44, une molécule impliquée dans le homing, dans des systèmes d'adhérence et dans l'activation des lymphocytes T

- 1. La migration des lymphocytes, les récepteurs du homing
 - 1.1. La migration des cellules se fait de façon sélective

- 1.2. La reconnaissance des cellules endothéliales.
 - 1.3. Les récepteurs du homing
 - 2. La molécule CD44, une molécule aux potentialités multiples.
 - 2.1. Les différentes recherches sur la molécule CD44
 - 2.2. Structure de la molécule CD44
 - 2.3. Les rôles de la molécules CD44
 - 3. La molécule CD44 et l'activation des cellules T
- résumé de l'article 2**

D] La molécule VLA-4, une intégrine aux multiples potentialités

- 1. Les sous-familles au sein de la famille des intégrines
- 2. La protéine CD29/CD49d ou VLA-4
 - 2.1. Premières caractérisations structurales
 - 2.2. Distribution de la molécule VLA-4
 - 2.3. Les différentes formes biochimiques de la molécule VLA-4
 - 2.3.1 Coupure de la sous-unité α^4 en fragments de 80 et 70 kDa
 - 2.3.2. La sous-unité α^4 peut s'associer à une chaîne de 30 kDa
 - 2.3.3. Association de α^4 avec une autre sous-unité β
- 3. Les ligands de la molécule VLA-4
 - 3.1. VLA-4 est un récepteur de la fibronectine
 - 3.2. VLA-4 est un récepteur pour VCAM-1 sur les cellules endothéliales activées
 - 3.3. Les sites de fixation de VLA-4 sur la fibronectine et sur VCAM-1 sont différents.
- 4. Les rôles fonctionnels potentiels attribués à la molécule VLA-4
 - 4.1. Action sur les cellules cytotoxiques
 - 4.2. Aggrégation homotypique T-T ou B-B.
- 5. Action suppressive et augmentation d'AMPc dans les lymphocytes CD4⁺

Résumé de l'article 3

E] L'activation des lymphocytes T par les "superantigènes"

- 1. Des toxines bactériennes mitogènes.
- 2. Ces toxines se fixent sur les molécules de classe II du CMH.

- 3. Les toxines se fixent sur les parties V β du TCR.
- 4. Des protéines virales se comportent comme des "superantigènes"
- 5. Mise en évidence d'un superantigène dans un modèle de SIDA murin.

F] L'apoptose dans le système immunitaire

- 1. L'apoptose dans la sélection du répertoire T au sein du thymus.
 - 1.1. La première découverte de thymocytes apoptotiques.
 - 1.2. Des anticorps CD3 induisent une mort par apoptose dans les thymocytes immatures.
 - 1.3. Les superantigènes et les antigènes sont capables d'induire l'apoptose dans les thymocytes immatures.
- 2. Les signaux d'activation entraînant l'apoptose
- 3. La mort cellulaire programmée dans le système immunitaire.
 - 3.1. L'activation des hybridomes T par le TCR provoque l'apoptose
 - 3.2. Maturation des cellules B lors de la réponse anticorps.
 - 3.3. Les facteurs de croissance agissent en prévenant l'apoptose.
 - 3.4 Le gène bcl-2 : un oncogène capable de prévenir l'apoptose.
 - 3.5. cytolysse médiée par les lymphocytes.
 - 3.6 Le TNF induit l'apoptose dans les cellules tumorales.
 - 3.7 Molécules de surface déclenchant la mort cellulaire.
 - 3.8 L'apoptose dans les cellules T matures.
- 4 Rôles relatifs de l'IFN γ et de l'IL2 dans l'induction d'une mort programmée par apoptose des cellules T à différents stades de différenciation.

Résumé de l'article 4

G] Le virus de l'immunodéficience humaine : mécanismes physiopathologiques

- 1. Le virus
 - 1.1. Nature du VIH
 - 1.2. Le génome du VIH.
- 2. L'infection par le VIH.
- 3. Les mécanismes immunopathologiques de l'infection par le VIH.

- 3.1. Les effets cytopathogènes du VIH
 - 3.1.1. Rôle direct du virus
 - 3.1.2. Mécanismes indirects
 - 3.1.2.1. Infection des cellules souches hématopoïétiques.
 - 3.1.2.2 cytotoxicité dirigée contre les cellules CD4⁺ non infectées.
 - 3.2. Dysfonctionnement des cellules CD4⁺.
 - 3.2.1. Augmentation des cellules suppressives.
 - 3.2.2 réponses autoimmunes
 - 3.2.3. Infection et destruction sélective des cellules mémoires.
 - 3.2.4. signaux inhibiteurs fournis par les protéines virales.
 - 3.2.4.1. la protéine gp120
 - 3.2.4.2 La protéine tat
 - 3.2.5. Hyperactivation des cellules et donc incapacité du système immunitaire à répondre à une stimulation ultérieure, transduction des signaux défectueuse.
- 4. l'hypothèse de la mort programmée par activation

Résumé de l'article 5

RESUME DE L'ENSEMBLE DES TRAVAUX

Résumé de l'ensemble des travaux.

L'ensemble de cette étude a été réalisé dans deux laboratoires différents.

Le laboratoire du Pr. A. Bernard à l'Institut Gustave Roussy de Villejuif, utilise les anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules de surface des leucocytes pour analyser la biochimie et la fonction de ces molécules. Ces anticorps monoclonaux peuvent également être utilisés comme outils thérapeutiques lors de greffe par exemple.

Dans le laboratoire du Pr. A. Capron, j'ai participé dans le cadre d'un programme de recherche sur le SIDA à la mise en évidence et à l'étude d'un phénomène de mort programmée par apoptose survenant après une activation sélective des cellules T CD4⁺ de patients infectés par VIH. Ce phénomène permettrait d'expliquer à la fois les dysfonctions précoces et la déplétion tardive des cellules T CD4⁺ de patients infectés. D'autre part, j'ai étudié d'une manière plus générale les différents mécanismes permettant d'induire une mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes T.

• Régulation de l'activation des lymphocytes T.

Il existe à la surface des lymphocytes T de nombreuses molécules permettant la régulation de leurs activités. Parmi celles-ci, le récepteur pour l'antigène (TCR) dicte la spécificité antigénique en interagissant avec l'association formée par un peptide antigénique particulier et une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) située à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène (APC). Les autres molécules ont été arbitrairement classées en deux catégories :

-les molécules d'adhésions qui servent à attacher le lymphocyte T aux cellules avec lesquelles il doit interagir

-les "récepteurs" qui transmettent à la cellule des signaux permettant la modulation de son activité..

Il apparait de plus en plus que ces deux fonctions peuvent être portées par les mêmes molécules. Parmi ces molécules pluripotentes on peut citer : CD2, CD4, LFA-1, CD44 et VLA-4. Nous avons pour notre part étudié plus particulièrement les molécules CD2, CD44 et VLA-4.

La molécule CD2 fut d'abord décrite comme une molécule d'adhésion permettant l'interaction du lymphocyte T avec les globules rouges de mouton. L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis de montrer qu'il

était possible d'induire la prolifération des lymphocytes T avec deux anticorps reconnaissant deux épitopes différents de cette molécule. L'isolement d'un ligand pour la molécule CD2, une molécule appelée LFA-3 (ou CD58) donnait une base moléculaire aux mécanismes d'adhésion décrits pour la molécule CD2. Pourtant, il n'est pas possible d'activer les lymphocytes T en utilisant la molécule LFA-3 purifiée. C'est pourquoi nous avons recherché s'il était possible de caractériser un deuxième ligand pour la molécule CD2 qui, en association, avec la molécule LFA-3 permettrait d'activer les lymphocytes T.

Nous avons isolé deux anticorps capables d'inhiber la formation de rosettes entre des cellules T et des érythrocytes humains ou de mouton. Ces anticorps reconnaissent une molécule de 19 kDa (H19). Cette molécule H19, impliquée dans le phénomène des rosettes pourrait donc être le deuxième ligand de la molécule CD2 recherché.

Nous avons ensuite, grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux, étudié le rôle physiologique de cette molécule en le comparant à celui de la molécule LFA-3 :

Nos travaux montrent outre l'existence d'un deuxième ligand éventuel pour la molécule CD2, que l'interaction de cette molécule avec ses ligands (LFA-3 mais aussi H19) est nécessaire lors de l'activation des lymphocytes T via CD3. Ce résultat apporte une nouvelle évidence de l'interrelation entre les molécule CD3 et CD2 lors de l'activation du lymphocyte T.

Par ailleurs, nous avons isolé un anticorps monoclonal, nommé P245, dirigé contre une molécule de 90 kDa et possédant toutes les caractéristiques d'un récepteur du homing, la molécule CD44.

Dans un premier temps, nous avons testé l'action de l'anticorps P245, sur l'incorporation de thymidine tritiée par des lymphocytes issus du sang périphérique stimulés par différents mitogènes T. L'ensemble de nos résultats montrent que des anticorps dirigés contre la molécule CD44 sont capables de compléter un signal d'activation fourni par des anticorps CD3 ou des paires d'anticorps CD2, et que le signal fourni par les anticorps CD44 est différent de celui fourni par les anticorps CD28.

Contrairement aux autres membres de la sous-famille β_1 des intégrines (les VLA) pour lesquelles seules des interactions cellule/matrice protéique intersticielle ont été décrites, la molécule VLA-4 est impliquée à la fois lors

d'interaction avec la matrice proteique extra-cellulaire mais aussi lors de contact entre cellules. Nous avons utilisé différents anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule VLA-4 afin de déterminer quel pouvait être son rôle dans l'activation des lymphocytes T.

L'anticorps K20 (un anticorps dirigé contre la chaîne β_1 de la molécule VLA-4) est capable d'inhiber complètement la prolifération des lymphocytes T activés par des anticorps CD3. Cette inhibition est corrélée à une augmentation importante de l'AMPc, un second messenger impliqué dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes. Contrairement à l'anticorps K20, les autres anti-VLA-4 n'ont soit aucun effet sur la prolifération des lymphocytes totaux du sang périphérique (comme 4B4), soit augmentent celle-ci (comme O403). Par ailleurs, les anticorps comme O403 sont capables d'inhiber l'effet supprimeur induit par les lymphocytes CD8⁺ sur la prolifération des lymphocytes CD4⁺ purifiés..

Il semble donc que la molécule VLA-4 serve à contrôler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ en transmettant le signal supprimeur apporté par les cellules CD8⁺. Cette molécule serait donc le récepteur (ou le ligand) d'une molécule présente à la surface des lymphocytes T supprimeurs CD8⁺.

• Etude de l'induction de l'apoptose dans les lymphocytes T, application à l'étude physiopathologique de l'infection par VIH.

L'induction de la prolifération des lymphocytes T nécessite à la fois la mobilisation du complexe CD3-TCR et un signal additionnel fourni par les cellules accessoires. Cependant, la mobilisation du TCR peut conduire à différentes réponses cellulaires en fonction du stade de maturation ou d'activation de la cellule T: la mort cellulaire dans les thymocytes et les cellules T activées, la prolifération ou l'anergie dans les cellules T naives.

Nous avons tenté, dans un modèle humain de mieux comprendre ces différentes modalités d'induction d'une mort cellulaire par apoptose dans des cellules T.

Nous avons étudié l'effet de la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans quatre types cellulaires :

- des thymocytes matures (phénotype CD4⁺8⁻ ou 4⁻8⁺)
- des lymphocytes T du sang périphérique (PBLT)
- des lymphoblastes PHA (phénotype CD4⁺8⁻ ou 4⁻8⁺)
- des lignées T dépendantes de l'antigène (phénotype CD4⁺8⁻)

Nous avons pu mettre en évidence que :

-La mobilisation du complexe CD3-TCR (réalisée par des anticorps CD3 fixés au fond des plaques de culture) entraîne la mort par apoptose dans les thymocytes, les lymphoblastes et les lignées T, alors que les PBLT restent apparemment au repos.

-Cette mort est inhibée par l'IL1, l'IL2 et les cellules accessoires (qui permettent également la prolifération des cellules) ; et par la cyclosporine A et les anti-IFN γ .

Pour mieux comprendre le rôle joué par les différentes interleukines dans l'induction de la mort par apoptose des lymphocytes T, nous avons étudié leur synthèse lors de la mobilisation du TCR.

-La mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans les thymocytes matures et les lymphoblastes induit la synthèse d'IFN γ mais pas celle d'IL2. L'addition du cosignal (ici l'IL1) permet la synthèse d'IL2 qui entraîne la prolifération des cellules. En revanche, la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans les lymphocytes T au repos n'entraîne pas de synthèse d'IFN γ , l'addition d'IL1 permet la synthèse d'IL2 et d'IFN γ induisant la prolifération des cellules.

La CsA ayant pour propriété d'inhiber la synthèse des interleukines sans inhiber l'expression de leur récepteur par exemple le récepteur pour l'IL2, nous l'avons utilisée pour mieux cerner l'effet de l'IL2 et de l'IFN γ sur ces différents types cellulaires que nous avons cultivés en présence d'anticorps CD3 fixés et de CsA. Dans ces conditions, nous n'avons observé ni synthèse d'interleukines, ni prolifération, ni mort cellulaire. L'addition d'IL2 permet la prolifération de ces différents types cellulaires alors que l'addition d'IFN γ induit une mort cellulaire par apoptose. De plus, même sur des PBLT stimulés par des anticorps CD3 en présence de monocytes, l'addition conjointe de CsA et d'IFN γ entraîne la mort des cellules par apoptose, alors que l'addition d'IL2 permet leur prolifération.

Ces résultats permettent d'envisager un modèle où sur des cellules T activées, la présence d'IFN γ en l'absence d'IL2 induirait une mort cellulaire par apoptose.

Le syndrome de l'immunodéficience acquise est causé par une disparition progressive et sélective des cellules T CD4⁺, cibles de l'infection par VIH. Cependant, la plupart des auteurs s'entendent pour reconnaître que la première dysfonction immunitaire détectée, et ceci plusieurs années avant la diminution du nombre absolu des cellules T CD4⁺ est l'incapacité

sélective de ces cellules à répondre aux antigènes mémoires et au Pokeweed mitogen. Par contre, les cellules T CD4⁺ conservent beaucoup plus longtemps la possibilité de répondre in vitro à des cellules allogéniques, à la PHA et à des anticorps CD3. Si ce constat est bien admis, la cause de cette dysfonction est inconnue.

Nous avons développé une hypothèse permettant d'expliquer à la fois la dysfonction précoce et la déplétion tardive des cellules T CD4⁺ des patients infectés par VIH-1 par un mécanisme unique : la mort cellulaire induite par activation ou mort cellulaire programmée ou apoptose .

Nous avons testé in vitro la prolifération des cellules T de patients asymptomatiques, ou de sujet normaux, en réponse à différents stimuli mitogéniques. Nous avons pu observer que les cellules T de patients VIH⁺ présentaient un déficit sélectif de réponse au PWM, aux antigènes mémoires ou à la mobilisation du récepteur T, dépendante des molécules de classe II du CMH, et conduite par les "superantigènes" comme l'enterotoxine staphylococcique B (SEB). Ce déficit de prolifération est corrélé à l'induction d'une mort cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ avec les caractéristiques de l'apoptose (nécessité d'une synthèse protéique, fragmentation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases et condensation de la chromatine). Comme pour les thymocytes, la cycloheximide et la cyclosporine A inhibent cette mort cellulaire induite par activation. Mais contrairement à ce qui est observé pour les thymocytes, ni les esters de phorbol, ni l'IL1, ni l'IL2 ni les anti-IFN γ ne sont capables d'inhiber l'apoptose des lymphocytes de patients VIH⁺. Seuls parmi les seconds signaux testés, les anticorps dirigés contre la molécule CD28 sont capables d'inhiber l'apoptose tout en restaurant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ de patients en réponse au PWM, aux "superantigènes" mais aussi aux antigènes mémoires.

Ces résultats suggèrent donc que les lymphocytes T CD4⁺ de patients asymptomatiques infectés par VIH-1 sont éduqués in vivo pour répondre à une activation sélective en se suicidant par apoptose.

ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T

ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T

La reconnaissance physiologique des antigènes par les lymphocytes T implique une interaction entre le récepteur T (TCR) et des fragments de l'antigène présentés en association avec une molécule de classe I ou de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I et II), à la surface d'une cellule présentatrice de l'antigène (CPA) (1-4)

•1. Le récepteur T

Le récepteur T est formé par l'association à la surface de la cellule T de 2 chaînes polypeptidiques α et β de 46-49 et 38-43 kDa respectivement (5-7). Les chaînes α et β du TCR sont constituées sur le même schéma que les immunoglobulines (8) avec une partie constante et une partie variable. La partie variable, qui dicte la spécificité antigénique, est le produit, au cours de la maturation de la cellule, d'un réarrangement aléatoire de 3 fragments génique issus des régions V (variable), D (diversity) et J (joining) du gène codant pour la chaîne α ou β (9). D'autre part, cette recombinaison se fait avec une haploïdie fonctionnelle ce qui signifie qu'il existe un seul type de TCR à la surface de chaque cellule T.

•2. Les cellules présentatrices de l'antigène.

Ce sont des cellules exprimant à leur surface des molécules CMH de classe II, en association avec d'autres molécules annexes nécessaires à l'activation des lymphocytes T (cf infra). D'une manière générale, car ce processus connaît des exceptions, ces cellules sont capables d'internaliser l'antigène et de le fragmenter en peptides dans ses compartiments cytosoliques. Ces compartiments croisent ensuite des vésicules issus du Golgi contenant des molécules du CMH de classe II et certains peptides antigéniques s'associent aux molécules du CMH dans une gouttière hydrophobe (complexe antigène-CMH) qui sera exprimée à la surface de la cellule lors de la fusion entre la vésicule et la membrane cytoplasmique (10,11). Les cellules présentatrices de l'antigène ne se contentent pas d'exprimer des peptides antigéniques à leur surface. Elles fournissent à la cellule T des signaux d'activation non spécifiques nécessaires à une bonne activation de la cellule. Ceci a pu être mis en évidence en utilisant des

cellules (comme les fibroblastes) n'expriment pas de façon naturelle les molécules du CMH de classe II mais chez lesquelles cette expression est inductible par l'interféron γ . Ces cellules sont capables de présenter des peptides antigéniques à leur surface et à ce titre sont capables d'activer des clones T spécifiques de l'antigène choisi (ces cellules T sont au stade G1 du cycle cellulaire). Par contre, les fibroblastes traités à l'IFN γ sont incapables de stimuler des cellules T CD4⁺ isolées du sang périphérique qui sont au stade G0 du cycle cellulaire (12,13). Cette capacité peut être restaurée par l'addition de monocytes même lorsque ceux-ci n'ont jamais vu l'antigène. Ainsi les fibroblastes activés sont incapables de stimuler les lymphocytes T car ils n'expriment pas à leur surface les molécules capables de compléter le signal donné par le complexe antigène-CMH. Par contre les monocytes ont cette capacité. On appelle donc CPA (cellules présentatrices de l'antigène) les cellules capables d'exprimer des molécules de classe II du CMH à leur surface et donc de présenter les peptides antigéniques. On appelle CA (cellules accessoires), les cellules capables de compléter un signal donné par les CPA. Ainsi les monocytes sont à la fois des CPA et des CA, les fibroblastes activés sont des CPA et par exemple les cellules endothéliales CMH-II négatives sont des CA (12,13)

Les signaux d'activation, résultants de la reconnaissance du complexe antigène-CMH par le TCR, sont transmis à la cellule par la molécule CD3, associée au TCR à la surface de la cellule.

•3. Le complexe CD3

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les parties variables du TCR a permis d'immunoprécipiter, outre les chaînes α et β du TCR, 4 chaînes supplémentaires (la molécule CD3) de poids moléculaire 28, 22, 20 et 18 kDa appelés γ , δ , ϵ , η ou ζ , montrant que le TCR et le complexe CD3 était physiquement liés à la surface de la cellule.(14,15). La démonstration de l'implication de ce complexe moléculaire dans l'activation des lymphocytes T a été faite en utilisant un anticorps monoclonal "OKT3" dirigé contre la molécule CD3, capable d'induire une prolifération des cellules T (16). Pour autant, le signal fourni par l'anticorps CD3 seul ne suffit pas (il représente en fait l'équivalent du signal fournit par les CPA) et il doit être complété par des signaux fournis par les cellules accessoires.(17,18). D'autre part, l'expression de la molécule CD3 à la surface de la cellule est nécessaire à la prolifération des lymphocytes T activés par différentes autres molécules (19-22). Ces résultats montrent donc que la molécule CD3 possède un rôle clef dans l'activation des lymphocytes T et notamment lors de la reconnaissance de l'antigène en transmettant à la cellule les différents messages d'activation.

Les changements biochimiques observés après la reconnaissance de l'antigène dans la cellule T et le rôle précis de ces différents seconds messagers ne sont pas encore bien compris. Il est clair, qu'immédiatement après la fixation du TCR sur le complexe antigène-CMH on observe une activation de la phospholipase C qui synthétise des inositol phosphates (IP₃ et IP₄) ce qui entraîne une augmentation du Ca²⁺ libre intracytoplasmique et la formation de diacylglycerol induisant une translocation et une activation de la protéine kinase C (PKC) (23-25). D'ailleurs les cellules T peuvent être activées par la conjonction d'une drogue augmentant la concentration de Ca²⁺ intracytoplasmique (le calcium ionophore) et d'une drogue (esters de phorbol tel le PMA) mimant le diacylglycerol et activant la PKC (26).

•4. Les différentes molécules participant à l'activation des lymphocytes T

Mais le complexe TCR/CD3 n'est pas le seul capable de stimuler les lymphocytes T ni le seul capable de produire des seconds signaux

d'activation de la cellule. La figure 1 montre que les CPA expriment à leur surface un certain nombre de ligands pour des récepteurs situés à la surface du lymphocyte T comme CD4, CD8, LFA-1, et CD2. Parmi ceux-ci, CD4, CD8 et LFA-1 ont été tout d'abord uniquement considérées comme des molécules d'adhésion (27,28) mais des travaux récents ont permis de montrer que ces molécules étaient capables elles aussi de transmettre des signaux de régulation à la cellule T (29,30). La molécule CD2 a très vite été considérée comme une molécule capable d'interagir dans des processus d'adhésion mais aussi de délivrer à la cellule un signal d'activation appelé de ce fait signal d'activation alternatif (31). De plus, il existe un certain nombre d'autres molécules à la surface du lymphocyte T capables de moduler son activation. Ces molécules peuvent être divisées arbitrairement en trois groupes :

i) Les molécules capables d'activer la cellule en conjonction avec le PMA : Thy-1 et Ly-6 (décrites uniquement chez la souris pour l'instant) (32,33), CD7 (34), CD43 (35), Tp45 (36), CD73 (37), Tp90 (38), Tp 135-145(39), Tp 103 (40), CD54 (41) et gp33-38 (42).

ii) Les molécules capables de compléter le signal incomplet fourni par la molécule CD3 (les ligands éventuels des molécules présentent à la surface des cellules accessoires) : HLA-A, B, C (43), CD28 (44), CD5 (45), CD6 (46), CD44 (47)

iii) Les molécules capables d'induire un signal d'inhibition de la prolifération : CD4, VLA-4 (48), CD45 (49), CD2 (50).

En résumé, de nombreux signaux sont délivrés à la cellule T lors de son interaction avec les cellules accessoires. Ces signaux sont transmis par des molécules différentes et semblent agir de manière coordonnée pour induire dans différents types cellulaires les réponses effectrices adéquates. Cependant, les mécanismes de régulation permettant d'intégrer ces différents signaux ne sont pas encore tous connus.

Nous avons étudié pour notre part les molécules suivantes :

- CD2 et ses différents ligands : LFA-3 (CD58) et H19 (CD59)
- CD44, un récepteur du homing participant à l'activation des lymphocytes T
- VLA-4, un membre de la famille des intégrines servant à réguler l'activation des lymphocytes T

LA MOLECULE CD59, UN LIGAND POUR CD2 ?

B] La molécule CD2 et ses différents ligands, rôles dans l'activation des lymphocytes T.

La molécule CD2, comme nous l'avons vu, a été très vite considérée comme une molécule d'adhésion, capable de fixer un ligand situé sur d'autres cellules, et comme une molécule capable de transmettre à la cellule un signal d'activation (31). L'activation de la cellule étant obtenue par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux, il restait à définir quel était le ou les ligands physiologiques de la molécule CD2 capables de transmettre ce signal d'activation et dans quelles conditions ce signal était apporté à la cellule. Nous avons tenté de répondre à ces questions en recherchant les différents ligands de la molécule CD2 et leur rôles respectifs dans l'interaction de la cellule T avec les cellules accessoires lors de l'activation de la cellule.

•1. Mise en évidence de la molécule CD2

Les cellules T possèdent la propriété de se fixer aux globules rouges de mouton pour former des rosettes E (pour erythrocytes). Cette capacité a d'ailleurs longtemps été utilisée pour caractériser et purifier les lymphocytes T (51,52). L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'identifier le récepteur pour les globules rouges comme étant une molécule de 50 kDa, présente à la surface de tous les lymphocytes T mais aussi de certaines cellules NK et apparaissant très tôt au cours de la maturation thymique (53,54). Mais l'intérêt qui lui est porté tient surtout à son rôle fonctionnel complexe.

•2. Rôle fonctionnel de la molécule CD2

Les premières descriptions du rôle fonctionnel de la molécule CD2 ont été obtenues en utilisant des anticorps monoclonaux CD2 capables d'inhiber l'activité des cellules T cytotoxiques (55) et de bloquer la réponse mitogénique des cellules T induites par des lectines (56) ou par des anticorps CD3 (57). Ces résultats, semblables à ceux obtenus avec des anti-LFA-1, montraient que la molécule CD2 était impliquée lors de l'adhésion entre la cellule cytotoxique et sa cible ou entre la cellule accessoire et le lymphocyte T.

La démonstration de l'envoi d'un signal prolifératif à la cellule par l'intermédiaire de la molécule CD2 a été faite par S. Meuer et al.(31) qui en utilisant une paire d'anticorps CD2 "T11₂ et T11₃" est capable d'induire la prolifération des lymphocytes T. Dans ce cas, la prolifération induite par les anticorps CD2 ne nécessite pas la présence de monocytes, contrairement aux résultats obtenus avec les anticorps CD3. Ce point sera controversé, notamment par les travaux de l'équipe d'A. Bernard, qui démontre un rôle important joué par le monocyte dans l'activation par CD2. La dépendance en monocytes varie suivant les paires d'anticorps CD2 utilisées qui induisent vraisemblablement des changements conformationnels différents (58,59).

•3. Inter-relations entre les voies d'activation CD3 et CD2.

Différentes observations ont suggéré une inter-dépendance entre les voies d'activation CD3 et CD2 sur les lymphocytes T. Suivant les conditions expérimentales, les anticorps CD3 sont capables, soit d'inhiber (60) soit d'augmenter (61) une activation des cellules T induite par des anticorps CD2. De même, des anticorps CD2 sont capables d'inhiber une prolifération induite via CD3 (57). Par ailleurs, l'interaction entre la molécule CD2 et ses ligands facilite la réponse à l'antigène médiée par le complexe CD3-TCR. Ainsi l'expression de la molécule CD2 humaine dans un hybridome T murin augmente fortement la réponse de cette cellule vis à vis de l'antigène (62). De plus, la démonstration de la coprécipitation spécifique de la molécule CD2 avec le complexe CD3-TCR fournit une base structurale à cette inter-dépendance (63).

L'inter-relation entre les voies d'activation CD2 et CD3 a ensuite été testée sur des mutants de la lignée leucémique Jurkat (64,65). Les cellules n'exprimant plus le complexe CD3-TCR ne répondent plus à une activation via CD2. Or cette réponse peut-être restaurée par la transfection du cDNA de la chaîne β du TCR qui permet la réexpression de l'ensemble du complexe CD3-TCR (chaînes $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon, \zeta$). Ceci montre que dans ces cellules leucémiques, la molécule CD2 ne fonctionne qu'en présence de la molécule CD3. De même la transfection du cDNA codant pour la molécule CD2 dans une cellule n'exprimant pas CD3 entraîne l'expression à la surface de la cellule d'une molécule CD2 non fonctionnelle (66).

Pourtant, il est bien établi que des anticorps CD2 peuvent activer des cellules NK qui n'expriment pas le complexe CD3-TCR (67). Ces cellules NK

CD2⁺CD3⁻ représentent une fraction importante des cellules NK et l'activation par des anticorps CD2 de ces cellules permet la lyse de cible NK-resistantes. Ces résultats sont donc en contradictions avec ceux obtenu avec la lignée Jurkat. Cependant, l'observation récente montrant que certains clones NK CD2⁺CD3⁻ expriment dans leur cytoplasmes la chaîne z de la molécule CD3, sans exprimer de molécule CD3 à leur surface, suggère que la chaîne z est la partie du complexe CD3-TCR nécessaire à l'activation via CD2 (68). De plus la chaîne ζ est également responsable de l'interaction du complexe CD3-TCR avec la tyrosine protéine kinase p59^{fyn} (69), ce qui renforce cette hypothèse.

• 4. Les ligands de la molécule CD2

L'importance de la molécule CD2 dans l'activation des lymphocytes T a conduit de nombreuses équipes à rechercher les ligands éventuels de cette molécule. Cette recherche s'est effectuée en sélectionnant des anticorps monoclonaux capables d'inhiber la fixation des lymphocytes T soit sur les globules rouges, soit sur les cellules endothéliales thymiques.

• 4.1. La molécule T11TS

T. Hünig a donc sélectionné des anticorps monoclonaux dirigés contre les globules rouges de mouton capables d'inhiber la formation de rosettes E. Il a pu mettre en évidence une molécule (appelée T11TS pour T11 target structure) d'environ 42 kDa exprimée en forte densité à la surface des globules rouges de mouton mais aussi sur les lymphocytes du sang périphérique et sur certaines cellules thymiques. (70,71). L'anticorps L180/1 (anti-T11TS) est également capable d'inhiber une réaction lymphocytaire mixte confirmant ici l'implication de la molécule T11TS dans une interaction fonctionnelle. Par la suite, l'utilisation de molécule CD2 purifiée a permis de montrer que la fixation spécifique de cette molécule sur les globules rouges de mouton était inhibable par un anticorps anti-T11TS (72). L'anticorps L180/1 ne se fixant pas sur les cellules humaines, il s'agissait alors de déterminer un équivalent humain de la molécule T11TS.

• 4.2. La molécule LFA-3.

Vollger et al. en utilisant chez l'homme la propriété des cellules du thymus (CD2 positives) à former des rosettes avec les cellules épithéliales thymiques (CD2 négatives) ont montré qu'il est possible de bloquer spécifiquement cette interaction avec un anticorps anti-LFA-3, une molécule présente à la surface de l'épithélium thymique (73). Cette molécule, une glycoprotéine de 55-70 kDa, est exprimée sur de nombreuses cellules et n'est pas restreinte aux cellules de la lignée hématopoïétique. L'utilisation des anticorps anti-LFA-3 a ensuite permis de montrer que cette molécule était bien le ligand de la molécule CD2 tant sur le globule rouge que lors de l'interaction des cellules cytotoxiques avec leurs cibles. Finalement, l'utilisation de molécules purifiées ou l'utilisation de cellules transfectées avec l'une ou l'autre de ces molécules a permis de confirmer leur fixation réciproque (74,75).

Ainsi l'interaction CD2-LFA-3 paraît très simple. Un récepteur d'une seule chaîne se fixe sur un ligand formé lui aussi d'une seule chaîne. D'autre part les deux molécules sont situées sur le chromosome 1 et toutes deux font partie de la superfamille des immunoglobulines avec de plus des homologies entre les deux molécules. Finalement, la restriction de l'expression de la molécule CD2 sur les lymphocytes T et la distribution très large de la molécule LFA-3 suggère que cette interaction facilite l'adhésion des cellules T sur toute cellule nécessitant une surveillance immunologique.

Pourtant cette interaction simple ne permet pas d'expliquer toutes les fonctions dévolues à la molécule CD2 et on peut penser que la simplicité de l'interaction CD2-LFA-3 est plus apparente que réelle. Ainsi, la molécule CD2 est une molécule complexe, capable d'adopter des conformations structurales différentes suivant l'état d'activation de la cellule, présentant des épitopes différents et servant aussi bien de molécule d'adhésion que de molécule d'activation. Quant à la molécule LFA-3, à la suite d'un épissage alternatif, elle peut être exprimée à la surface de la cellule soit sous la forme d'une molécule transmembranaire classique, soit sous la forme d'une molécule fixée à la membrane par un pont inositol phosphate (76). De plus, les travaux réalisés dans le laboratoire d'A. Bernard ont permis de caractériser au moins deux molécules supplémentaires impliquées dans les phénomènes des rosettes E (érythrocytaires) : La molécule E2, présente sur le

lymphocyte T aux cotés de la molécule CD2 (77) et la molécule H19 (CD59) un deuxième ligand éventuel pour la molécule CD2 (78).

• 4.3. Les autres ligands de la molécule CD2

Les tentatives infructueuses faites au niveau fonctionnel pour déclencher l'activation du lymphocyte T par une interaction entre les molécules CD2 et LFA-3 suggère l'existence d'autres ligands. En effet, il n'est pas possible d'induire la prolifération des lymphocytes T en cultivant ces cellules avec des globules rouges seuls, il faut pour y parvenir, ajouter un anticorps CD2 (79). Si à la place des globules rouges on utilise la molécule LFA-3 purifiée, il faut ajouter au moins une paire d'anticorps CD2 à doses submitogéniques pour déclencher la prolifération des lymphocytes T (80).

Les premiers travaux d'A. Bernard, qui comme T. Hünig, sélectionnait des anticorps monoclonaux anti-globules rouges de mouton capables d'inhiber la formation des rosettes E. ont permis de mettre en évidence 3 molécules du globule rouge de mouton impliquées dans ce phénomène. Une molécule de 42 kDa (anticorps N23) qui est l'analogue de la molécule T11TS et de LFA-3 chez l'homme, une molécule de 110-220 (anticorps N217) qui correspond certainement à l'équivalent de la molécule LFA-1 et une molécule de 14 kDa (anticorps N4) correspondant à la molécule H19 ou CD59 chez l'homme. Ces résultats montrent qu'en fait, l'interaction de la molécule CD2 avec ces ligands est complexe. (81).

• 5. La molécule H19 (CD59) : une molécule présente à la surface des leucocytes, impliquée dans le phénomène des rosettes et nécessaire à l'activation des lymphocytes T. Un deuxième ligand pour la molécule CD2 ?

• 5.1. Résumé de l'article 1

L'équipe d'A Bernard (81) avait décrit à la surface des globules rouges de mouton une molécule de 14 kDa qui, en plus de l'équivalent de la molécule LFA-3, était impliquée dans le phénomène des rosettes érythrocytaires. Nous avons donc recherché parmi des anticorps monoclonaux dirigés contre des globules rouges humains, ceux reconnaissant une molécule similaire.

Nous avons isolé deux anticorps d'isotype $\gamma 1$ et $\gamma 2a$ capables d'inhiber la formation de rosettes entre des cellules T et des érythrocytes humains ou de mouton. Ces anticorps reconnaissent une molécule de 19 kDa (H19) qui comme LFA-3 n'est pas uniquement exprimée sur les érythrocytes mais aussi sur les lymphocytes T, les thymocytes, les monocytes, une partie des granulocytes et certaines cellules endothéliales. En revanche, cette molécule n'est pas exprimée sur les lymphocytes B. De plus, comme pour la molécule LFA-3, la molécule H19 purifiée est capable d'inhiber la formation de rosettes entre les cellules T humaines et les globules rouges de mouton ou humains. Cette molécule H19, impliquée dans le phénomène des rosettes pourrait donc être le deuxième ligand de la molécule CD2 recherché.

Nous avons ensuite étudié, grâce à l'utilisation des anticorps monoclonaux, le rôle physiologique de cette molécule en le comparant à celui de la molécule LFA-3. Et en effet, comme la molécule LFA-3, la molécule H19 est nécessaire à l'activation des lymphocytes T mais avec quelques différences:

- Les anticorps anti-H19 inhibent la prolifération des lymphocytes issus du sang périphérique stimulés par des anticorps CD3. Contrairement aux anti-LFA-3, les anti-H19 sont incapables d'inhiber une prolifération induite par des paires d'anticorps CD2. Des résultats semblables sont obtenus en utilisant la molécule H19 purifiée.

- Les molécules H19 et LFA-3 sont présentes à la surface des monocytes mais aussi à la surface des lymphocytes T. Pour montrer le rôle des molécules (H19 et LFA-3) présentes à la surface du monocytes lors de l'activation de la cellule par des anticorps CD3, nous avons utilisé un système où des monocytes, préalablement incubés avec des anticorps anti-LFA-3 ou anti-H19, sont fixés à la paraformaldéhyde avant d'être ajouté aux lymphocytes T purifiés. Ces cellules T sont ensuite activées soit par des anticorps CD3 soit par des anticorps CD2 en présence ou en l'absence d'IL1. Dans ces condition on observe que :

- en l'absence d'IL1 exogène, les monocytes traités par des anti-LFA-3 ou des anti-H19 sont incapables de compléter l'activation des lymphocytes T via CD3 ou CD2. Ceci montre que ces deux molécules à la surface des cellules accessoires sont bien nécessaires à l'activation des lymphocytes T.

Pour comprendre pourquoi les anti-H19, contrairement aux anti-LFA-3, sont incapables d'inhiber la prolifération induite via CD2 sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), nous avons observé l'effet d'IL1 exogène dans le système de monocytes fixés. En présence de faible

quantité d'IL1, reproduisant le cas des lymphocytes totaux, les anti-H19 ne sont plus capables d'inhiber une prolifération induite via CD2 alors que les anti-LFA-3 sont toujours efficaces.

En conclusion on peut dire que les molécules LFA-3 et H19, toutes deux impliquées dans le phénomène des rosettes et donc pouvant toutes deux être des ligands pour la molécule CD2, sont également nécessaires à l'activation des lymphocytes T.

Ces travaux montrent outre l'existence d'un deuxième ligand éventuel pour la molécule CD2, que l'interaction de cette molécule avec ses ligands (LFA-3 mais aussi H19) est nécessaire lors de l'activation des lymphocytes T via CD3. Ce résultat apporte une nouvelle évidence de l'interrelation entre les molécule CD3 et CD2 lors de l'activation du lymphocyte T.

• 5.2. La molécule H19 est un deuxième ligand pour CD2.

Récemment l'équipe du Pr. A. Bernard, en utilisant une lignée de cellules de hamster (CHO) transfectée soit avec le molécule LFA-3 (CD58), soit avec la molécule H19 (CD59) soit avec les deux molécules a pu mettre en évidence que (83):

- la molécule H19 (CD59) est responsable de l'adhésion observée entre les lymphocytes T et les cellules CHO, CD59⁺. Le pourcentage de rosette observé est de 12 % environ.

- Les cellules CHO, CD58⁺ se fixent sur les lymphocytes T par l'intermédiaire de la molécule LFA-3 et le pourcentage de rosettes obtenues est de 29 %.

- Les cellules CHO transfectées avec les deux molécules CD58 et CD59 forment jusqu'à 80 % de rosette avec les cellules T ce qui montre un effet de coopération entre ces deux molécules dans le processus de fixation aux lymphocytes T.

D'autre part ces cellules de hamster transfectées avec différentes molécules ont été utilisées comme cellules accessoires pour compléter une activation des lymphocytes T médiée par des doses submitogéniques de PHA et d'IL1. Ces expériences ont montré une nouvelles fois le rôle direct de la molécule H19 (CD59) dans l'activation des lymphocytes T et l'effet synergique résultant de la présence des deux molécules CD58 et CD59 à la surface des cellules accessoires.

• 5.3. Les autres rôles de la molécule H19, la résistance aux attaques du complément.

Les globules rouges humains expriment à leur surface des protéines permettant de les protéger des attaques du complément. La molécule CD59 fait partie de ces molécules (84-86). Elle agit apparemment en inhibant la fixation de la protéine C9 sur le complexe C5b-8 (87). En effet, des anticorps dirigés contre la molécule CD59 sont capables d'augmenter la susceptibilité des cellules humaines aux attaques du complément (88,89,86). De plus, la reconstitution de globules rouges hétérologues ou d'érythrocytes humains déficients avec la molécule CD59 induit une résistance des cellules à la lyse par le complément (89,,87). De même, la transfection de cellules de rat avec la molécule CD59, les protège d'une attaque par le complément humain et que cet effet protecteur est inhibé par des anticorps CD59 (86).

Ces résultats montrent donc que la molécule CD59, outre son rôle dans l'activation et l'adhésion des lymphocytes T sert à protéger les érythrocytes mais aussi les cellules nucléées d'une attaque du complément. Le rapport entre ces deux rôles très différents n'est pas encore connu mais fait l'objet de recherche dans le laboratoire du Pr. A. Bernard.

• 5.4. Structure de la molécule H19

La molécule CD59 a été clonée et séquencée par deux groupes différents travaillant sur le complément. Le cDNA code pour une protéine de 11,5 kDa ce qui signifie que le poids moléculaire apparent en SDS-PAGE est due à des résidues glycosylés en N ainsi qu'à l'addition post-transcriptionnelle d'un résidu permettant de fixer les phosphatidyl-inositol. En effet la molécule CD59, comme d'ailleurs certaines formes de la molécule LFA-3, est fixée à la membrane plasmique par un inositol-phosphate.

De plus la séquence de la molécule CD59 présente des homologies avec une famille de protéines murines fixées à la membranes par des ponts inositol-phosphate, les molécules LY-6. Ces protéines sont également impliquées dans l'activation des lymphocytes T (33). Cependant la démonstration du rôle des molécules de la famille LY-6 dans la protection vis à vis du complément n'ayant pas encore été faite, on ne peut-être sûr de l'identité fonctionnelle de ces différentes molécules.

A 19-kDa HUMAN ERYTHROCYTE MOLECULE H19 IS INVOLVED IN ROSETTES, PRESENT ON NUCLEATED CELLS, AND REQUIRED FOR T CELL ACTIVATION

Comparison of the Roles of H19 and LFA-3 Molecules in T Cell Activation¹

HERVE GROUX, STEPHANE HUET, FRANÇOISE AUBRIT, HIEU CONG TRAN,
LAURENCE BOUMSELL, AND ALAIN BERNARD²

From the Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs de l'Enfant, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, and INSERM U93, Hôpital Saint-Louis, 75475 Paris Cedex, France

We have previously described a molecule on the SRBC surface which, in addition to the sheep equivalent of LFA-3, is involved in the process of rosette formation. It is made of a single, 14- to 19-kDa, polypeptid chain, and we termed this molecule S14. We have now identified, on the human E a molecule with a similar *M_r*, albeit somewhat higher (19 kDa). The mAb against H19 efficiently block autologous or homologous rosettes by binding to human E. In addition, purified H19 molecules block rosettes made with human E and SBRC in a dose-dependent manner. The H19 molecule, like LFA-3, is not limited to the E surface, but is also present on many nucleated cells, including T cells and monocytes. Moreover H19, like LFA-3, is required for T cell activation: when we stimulated whole PBMC anti-H19 blocked [³H]TdR incorporation triggered via CD3, but not via CD2, in contrast to anti-LFA-3 that inhibited activation via both pathways. When a mixture of highly purified T-PBL and autologous paraformaldehyde fixed accessory cells (AC) was cultivated, anti-H19 or anti-LFA-3 mAb bound to AC blocked T cell proliferation. When high amounts of rIL-1 (100 U/ml) were added to purified T-PBL, no AC were required to sustain their proliferation upon stimulation via CD2, contrary to stimulation via CD3. When lower amounts of rIL-1 (10 U/ml) were used, fixed AC were still necessary to sustain proliferation via CD2. In this latter situation, anti-H19 mAb bound to AC could no longer inhibit T cell proliferation, whereas the anti-LFA-3 mAb was still inhibitory. When T-PBL were stimulated via CD2 in the presence of 100 U/ml of rIL-1, anti-LFA-3 did not induce any inhibition. Thus the inhibitory effect of anti-H19 and anti-LFA-3 mAb can both be accounted for by an effect on the AC molecules only, and not on the T cell molecules. F(ab')₂ fragments of anti-H19 mAb produced the same pattern of in-

hibition as the whole Ig molecule, excluding an effect via the FcR. Moreover, purified preparations of the H19 molecules also produced inhibition. Thus, the signaling in which H19 and LFA-3 are involved is different: H19 is involved in a signal to T cells that is required under all circumstances to complement the primary stimulus delivered via CD3 and which is required to complement the primary stimulus delivered via CD2 only when no IL-1 is available; LFA-3 is involved in a signal that is always necessary to complement the primary stimuli delivered via CD2 or via CD3, except when high amounts of rIL-1 are present.

T cells are surveying, circulating cells that interact with many other cells. Thus, they display particular adhesion properties. The spontaneous formation of rosettes which occurs between human T cells and E from various species, including sheep and human, can be regarded as reflecting the physiologic events of cell adhesion (1-3). The interaction between CD2—on the T cell side—and LFA-3—on the RBC side—has recently been identified as a major event in determining rosette formation (4-8). LFA-3 is found extensively on nucleated cells (9). The interaction between CD2 and LFA-3 has also been identified as a mediating factor in the adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells (10, 11), and cytotoxic T cells to their targets (12, 13). Because CD2 mediates T cell activation (14, 15), this molecule can be seen to play a central role in the control of T cell adhesion/activation by interacting with LFA-3 and maybe other ligands (11, 16, 17).

In addition to identifying the equivalent of LFA-3—first described and termed T11TS by Hünig (18-20), and termed S42 by our group (21)—we have been able to identify on the SRBC surface two other molecules involved in rosette formation (21), because monoclonal and polyclonal antibodies directed against these two molecules block rosettes. We have termed these molecules S14 and S110-220, according to their *M_r*: the first molecule is made of a single, 14- to 19-kDa chain and the second is an heteromultimere associating a 100-kDa chain with a 200-kDa chain. Although raised against SRBC, the mAb against the 14- to 19-kDa molecule also blocked rosettes made with human E, indicating the presence of similar molecules in humans. Yet, the reactivities of the mAb against the sheep molecule was very poor

Received for publication November 29, 1988.

Accepted for publication January 30, 1989.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (CRE N. 873005), Institut Gustave-Roussy (CRC N. 87D6), Electricité de France (N. 800 L18) et Fondation de France.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed.

with the human cells, and did not allow characterization of the human molecule. In the present study, we raised mAb against the putative human counterpart of the 14- to 19-kDa molecule—we have termed H19—and we report on its biochemical characterization, its presence on nucleated cells and its role in T cell activation. We bring evidence that the H19 molecule from monocytes is required to achieve T cell activation and have compared its role with the role of LFA-3 on monocytes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the anti-E mAb. Mice from the Blozzi high responder strain were immunized with four i.v. injections of 5×10^7 human RBC, at 2-wk intervals. Spleens were collected 4 days after the last injection, and fused with the NS1 plasmacytoma cell line as previously described (22). Hybridoma supernatants from aged cultures were screened on the basis of inhibition of T cell rosettes as described below. After cloning by two consecutive limiting dilution cultures, the hybrid cells were injected i.p. into nude mice raised under germ-free conditions, and ascites fluids were collected. The mAb were purified from ascites by HPLC (LKB Instruments-Pharmacia), with a DEAE column (23), with an appropriate discontinuous gradient for each mAb. Ten fractions containing the activity and a single H and L chain band, as revealed by Comassie blue staining of SDS-PAGE, were retained and pooled. Isotype determinations were performed after this purification procedure by using immunodiffusion technique (24), and by analyzing serial dilutions of the mAb preparations. Antisera specific for class and subclass mouse Ig were obtained from Litton Bionetic Inc.

In some experiments we used Fab or F(ab')₂ fragments of W6/32 mAb prepared, respectively, with a papain or pepsin digestion of purified mAb, and recovered by HPLC as described elsewhere (25). We tested for absence of Fc fragments by using SDS-PAGE and immunofluorescence assay, in which we observed an absence of labeling by using directly fluoresceinated protein A.

Other antibodies used. The CD3 mAb used were OKT3 (IgG2a; Ortho Diagnostics), Leu-4 (IgG1; Becton Dickinson), and X35 (IgG2a; generous gifts from Dr. Bourel, CTS Rennes, France). The CD2 "T11," (IgG2a) used in this study was from our own laboratory, and displayed all the criteria that characterize mAb belonging to the 9.6/T11 group (15). mAb CD2 "D66" (IgG2b) and "GT2" (IgG2) were also from our own laboratory (26, 27). The CD18 "M232" mAb (2a) is from our own laboratory, and was investigated during the common studies of the Third International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens.

Biochemical characterization of H19. The molecule recognized by the mAb H19 was characterized by SDS gel electrophoresis after immunoprecipitation from NP-40 lysates of surface-labeled thymocytes or E. The techniques used have been extensively described elsewhere including minor modifications (28–30).

Cell preparations and cultures. PBMC were isolated by Ficoll-Hypaque density centrifugation. The method used to purify T cells comprised four steps and has already been described in detail (27). Briefly, the first step involved the adherence of PBMC in plastic culture dishes and collection of non adherent cells. The second step was to remove monocytes by passing over a magnet of iron ingesting cells within the non adherent cells. In the third step, the fraction of cells that had not ingested carbonyl iron was washed and incubated with L-leucine methyl ester (Sigma Chemical Co.), a procedure shown to selectively lyse accessory cells (31). Finally, in the fourth step, residual monocytes and B cells were eliminated by treating them with rabbit C and a mixture of CDw14 "M02" and HLA-DR mAb. After these procedures, the cell preparations were checked carefully for purity, and the only preparations retained (>99% CD2-positive cells) were those which contained no detectable cells reacting with the CDw14 "M02" (generous gift from Dr. Schlossman) and HLA-DR antibody (less than 1000 cells on smears were examined microscopically) and which showed no significant [³H]TdR incorporation when cultivated with optimal concentrations of PHA or Con A.

Monocytes were recovered at the adherence step of T cell purification, and then further treated with CD5 "A50" mAb (32) plus C. Such preparations contained 85 to 95% CDw14-M02 cells but no detectable CD2 or CD5 cells, and were unable to proliferate when cultivated with mitogens. In some experiments, monocytes were fixed by treating them with 1% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. Cells were then washed four times and were kept in RPMI at 4°C until 1 wk before use, although they could be kept for several weeks. Cell cultures were performed in 96-well culture plates as previously described (26).

Immunofluorescence assays. Cells were stained with saturating amounts of mAb and staining was revealed (unless the reagent was directly fluoresceinated) by affinity-purified FITC-conjugate goat anti-mouse Ig (Mely Laboratories, Springfield, VA) as described previously (27). Cells were analyzed by using cytofluorometry (Ortho-Becton Dickinson, System 50) as described elsewhere (25). The negative control used was taken from the same cell preparation, but stained with ascites containing an irrelevant antibody.

T cell rosette formation. E were collected weekly and kept in Aelsever solution. Detailed procedures for collection, storage, and preparation of RBC, as well as treating them with 2-aminoethylisothiouonium (Sigma) and neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg, West Germany), rosette formation, and rosette inhibition assays have been described (27). Briefly, blocking experiments were performed as follows. RBC preparations were incubated with serial dilutions of purified mAb or molecules, for 20 min at room temperature. Next, the appropriate amount of nucleated cells was added and the mixture was centrifuged and incubated at the appropriate temperature(s). Rosettes were counted as lymphocytes tightly bound to at least three RBC. In some experiments, either RBC or lymphocytes were preincubated with mAb or molecule preparations, washed three times with MEM-Tris + FCS before allowing the formation of rosettes. Each experiment of rosette inhibition was performed on at least five different occasions.

Purification of H19 molecule. Batches were prepared from 500×10^9 lysed human RBC. Membrane lysates were incubated overnight onto Sepharose bead-immobilized anti-H19 mAb (30 mg of HPLC purified antibody, 3.5 ml of swollen beads). The immunoabsorbent columns were successively washed and the adsorbed H19 molecules were then recovered by elutions with 0.05 M diethylamine-deoxycholate (pH 11.50) as described. The eluates were adjusted at pH 8.30 by adding 1 M Tris-HCl (pH 7.40) and next dialyzed twice against 50 mM Tris-HCl (pH 8.30), 2 mM Iodoacetamide, 1 mM PMSF, and 5 mM EDTA and finally dialyzed four times against PBS. In order to remove any possible contamination by mAb that could have been eluted from the immunoabsorbent column, the purified preparations were subsequently affinity chromatographed through a Sepharose-protein A column. To check their purity, the preparations were labeled with ¹²⁵I by using the chloramine T method and subjected to SDS-PAGE. Preparations of purified E molecules used for "functional" assays were obtained by resuspending the lyophilized material in PBS, and adding three more steps of dialysis against PBS. This material proved to be nontoxic to the growth of lymphoid cell lines and produced no lysis of E.

RESULTS

mAb blocking rosettes with human E. We immunized mice from the new Blozzi' selection of high responders (22) with whole human E, as indicated in *Materials and Methods*, and looked for hybridomas whose supernatants blocked rosettes between human E and thymocytes. We thus retained two different clones that recognize the same molecule, as revealed by full competitive binding and sequential immunoprecipitation (not shown). Anti-H19 clone 1 is an IgG2a; clone 2 is an IgG1 as revealed by immunodiffusion experiments (not shown).

Figure 1 displays the blocking activity of the mAb on rosettes formed between human E and thymocytes and on autologous rosettes with PBL. In a first set of experiments, the mAb were added to the soluble phase in the presence of the two cell partners for rosettes (Fig. 1A). In a second series of experiments, the mAb were preincubated with either the human E or the thymocytes, which were then washed before the other cell partner was added and the rosettes allowed to form (Fig. 1, B and C). The patterns of rosette inhibition were clearcut: the 2 mAb against the H19 molecule blocked rosettes by binding to human E. Note that effective blockade was seen down to low amounts of antibody, although none of these antibodies proved as effective as the anti-LFA-3 mAb, included in these experiments for comparison. Autologous rosettes, performed with PBL and RBC from the same individuals, were also inhibited (Fig. 1D). When rosettes were formed with RBC from different animal species, in

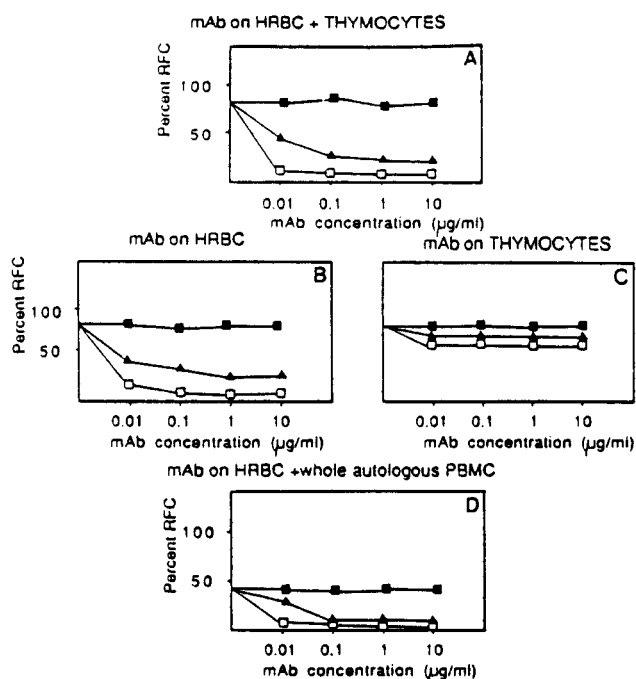


Figure 1. mAb against H19 inhibit T cell rosettes made with human E. mAb were purified from ascites by HPLC and quantified by the Mancini technique (24). (A) Human E (6×10^6) were incubated with human thymocytes (0.6×10^6) in 50 μ l of PBS, containing the indicated amounts of mAb anti-H19 (\blacktriangle), anti-LFA-3 (\square), control (\blacksquare), for 10 min at 4°C, followed by 10 min at 37°C and rosettes were then allowed to form. (B) Human E were preincubated with the indicated amounts of mAb, washed three times before adding human thymocytes and allowing rosettes to form. (C) Thymocytes were preincubated with the indicated amounts of mAb, washed three times before human E was added and rosettes allowed to form. (D) Inhibition of rosettes made with human PBL and autologous E.

particular sheep, no blocking was observed, indicating that the epitope(s) detected is peculiar to human molecules (not shown).

Tissue distribution of the molecule involved in autologous rosettes: its presence on the T cell surface. Significant and identical reactivity in immunofluorescence with human RBC was seen with the two mAb against H19. Treatment of human E with neuraminidase or 2-aminoethylisothiuronium did not increase the reactivity of the two anti-H19 mAb.

The reactivity patterns of the two anti-H19 mAb with various nucleated cells are displayed in Figure 2. Interestingly, the H19 molecule was present on T cells and monocytes, but was not detected on B-PBL. It was detected on a subpopulation of granulocytes. The presence of the molecule, however, is not limited to leukocytes, because nonhemologic cell lines also carry this molecule. The active synthesis of H19 by T cells was demonstrated by treating T cells with trypsin, which completely destroyed the molecule. These molecules were then reexpressed after culture (not shown).

The M_r of the molecule involved in autologous rosettes. The M_r were assessed by immunoprecipitation and SDS-PAGE of 125 I-surface labeled human E and human thymocytes. A single broad band extending from the 19-kDa up to the 26-kDa region, was revealed by PAGE performed either under reducing or under nonreducing conditions (Fig. 3).

Purification of H19 molecule; effects of purified molecules on rosettes. H19 was purified by mAb immunoaffinity chromatography from lysates of human RBC. H19

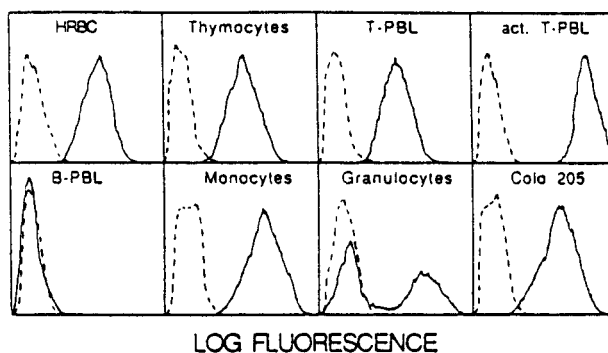


Figure 2. Fluorescence histograms obtained after staining cell populations with mAb against H19 (H19 clone 1, γ 2a). T cells were purified and controlled as described in *Materials and Methods*. B cells or monocytes were investigated after sorting out mononuclear cells which did not form rosettes. These cells were first gated on the scattergram (narrow vs right angle scatters) and fluorescence was then measured in the appropriate windows. Reactivity with granulocytes was assessed in a similar way, by using the whole of the leukocyte population. Controls in these experiments included a pan-B (CD20 "B1"), a pan monocyte (CD14 "M02"), and a pan granulocyte mAb (CD15 "80H5"). These revealed more than 95% pure cell preparations. Activated T cells were 3-day T-PBL cultivated with PHA or Con A, or 6-day T-PBL in MLC; all of these cell populations gave similar histograms.

purified by this procedure proved to have no detectable contaminant by migration on SDS-PAGE as investigated by autoradiography or by silver staining of the gels (Fig. 4A). Both procedures revealed a broad band similar to the band obtained by immunoprecipitation of 125 I-surface-labeled E. Approximately 30 g of purified material were recovered from 500×10^9 RBC.

Various amounts of purified molecules were preincubated with thymocytes. This abolished rosetting with human and sheep E in a dose-dependent fashion (Fig. 4, B and C). Because anti-H19 mAb did not block rosetting with SRBC, it was possible to test the specificity of this inhibition by adding anti-H19 mAb to the purified H19 preparation. This abolished the capacity of the H19-purified preparation to inhibit rosettes (Fig. 4C). Other controls included incubation of buffer with mocked elution of the immunoaffinity column and a purified preparation of glycoprotein molecules.

The effects of anti-H19 mAb on T cell activation. Because H19, like LFA-3, is present on T cells and monocytes, and as anti-LFA-3 mAb block T cell activation and cytotoxicity, it was of interest to see whether the anti-H19 mAb would also interfere with T cell activities. This proved to be the case. We found that one of the two mAb against H19 (clone 1, IgG2a) had a blocking effect on [3 H] TdR incorporation by whole PBMC. This effect was limited, however, to stimulation by a CD3 mAb (Fig. 5A). No inhibitory effect could be detected when PBMC were stimulated by various mitogenic pairs of CD2 mAb, even when used in suboptimal amounts, nor upon stimulation with lectins or allogeneic cells, regardless of the amount of anti-H19 mAb added (Fig. 5A). To exclude that the inhibition exerted by the anti-H19 mAb could have been due to its having a particular ability to compete for the monocyte FcR (this is an IgG2a antibody) we have stimulated whole PBL with IgG1 CD3 mAb. The result observed was a potent inhibitory effect (not shown). Finally, Fab and F(ab')₂ fragments of the anti-H14 clone 1 (IgG2a) produced the same pattern of inhibition according to the stimulus used as the whole Ig with the same intensity on a molar concentration basis (Fig. 5A).

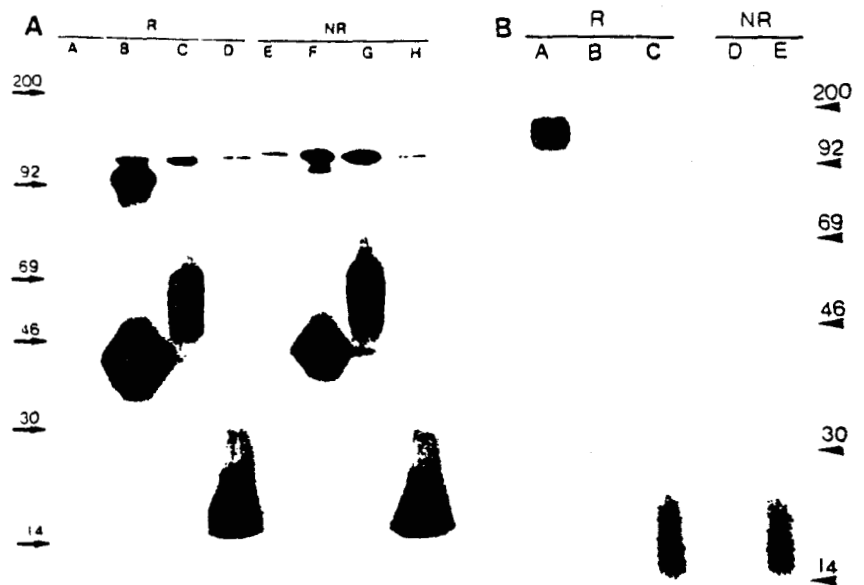


Figure 3. Molecular weight study of H19, determined by immunoprecipitation followed by SDS-PAGE after surface labeling. (A) Immunoprecipitations from human E. R for reduced, NR for nonreduced, gel at 10%; lanes A and E, immunoprecipitation with an irrelevant mAb; lanes B and F, immunoprecipitation with an anti-glycophorin mAb; lanes C and G, immunoprecipitation with an anti-LFA-3 mAb; lanes D and H, immunoprecipitation with the anti-H19 mAb. (B) Immunoprecipitations from human thymocytes, gel at 10%; lane A, immunoprecipitation with the CDw29 "K20" mAb as a positive control of high mol wt; lanes B and D, immunoprecipitation with an irrelevant mAb; lanes C and E, immunoprecipitation with an anti-H19 mAb.

None of the mAb against H19 was found to block CTL, raised against allogeneic cells, at their effector phase (Fig. 5A). These experiments also included tests measuring the effects of an anti-LFA-3 or a CD18 mAb ("M232") for comparison. As previously described (9, 33), these antibodies, contrary to anti-H19, inhibited all the T cell functions tested.

The target cell of the inhibitory activity of anti-H19 and anti-LFA-3 mAb. Because monocytes are required in order to achieve T cell stimulation and as the H19 and LFA-3 molecules are present both on the T-cell and monocyte surfaces, our next step was to investigate which cell type anti-H19 and anti-LFA-3 mAb act upon. To achieve this, we extensively purified T cells and monocytes and have incubated the mAb first with the monocyte population: these sensitized cells were then fixed with mild paraformaldehyde treatment, and mixed again with the autologous T cells for stimulation in culture. The mAb against the H19 molecule continued to exert a potent inhibitory effect when these cell preparations were stimulated by CD3 mAb of different isotypes (Fig. 5B). In addition, a clear inhibition of T cell activation via CD2 was seen, irrespective of the CD2 mAb pair (Fig. 5B). However, there was still no inhibition observed when these cell preparations were stimulated with lectins (not shown). Thus we can conclude that the anti-H19 mAb exerted a potent inhibitory effect via the monocyte molecule. The same experiments were performed with the anti-LFA-3 mAb, which shows similar results and led to similar conclusion.

In a second series of experiments with the same cellular system, the effects of anti-H19 and anti-LFA-3 were measured in the presence of rIL-1 (Fig. 5C). We had previously shown that, in the presence of 100 U/ml of rIL-1, no AC³ is required to achieve proliferation of purified T-PBL stimulated via CD2 contrary to stimulation via CD3. When lower amounts of rIL-1 are added (10 U/ml), however, fixed AC are still necessary to sustain a plenary level of proliferation both via CD2 and via CD3 (Fig. 5C). In this latter situation, namely with 10 U of rIL-

1, it can be seen from Figure 5C that the anti-H19 mAb bound to AC could no longer inhibit T cell proliferation, whereas the anti-LFA-3 mAb still induced a significant inhibition. These results are consistent with the results we had by stimulating whole PBMC in the presence of the anti-H19 or anti-LFA-3 mAb added in the soluble phase (see above and Fig. 5A). Finally, the effects of anti-H19 and anti-LFA-3 mAb were assayed on purified T-PBL stimulated via CD2 in the presence of 100 U/ml of rIL-1. This resulted in no inhibition (Fig. 5C) arguing that no inhibitory effect of the mAb are due to an action on the T cell molecules. Thus, the whole results obtained can be explained by an effect on the AC molecules only. Overall, these results also show that LFA-3 and H19 are not involved in the same signaling of AC to T cells.

Note that controls used in the above experiments demonstrated no detectable elution of the mAb from the accessory cell surface, neither under immunofluorescence nor in terms of functional interference with T cell proliferation.

Purified H19 molecules block T cell activation. Because purified H19 molecules could block rosettes, by binding to a putative ligand on the T cell, and as we have concluded that the H19 molecule from AC contribute to activate T cells by binding to a putative ligand on T cells, we sought to determine whether purified H19 molecules could interfere with T cell activation triggered by various stimuli. Figure 6 shows that purified preparations of H19, when added to culture of whole PBL, or mixture of T-PBL with autologous fixed monocytes, did block activation via CD3, but not by mitogenic lectins or allogeneic cells therefore producing the same pattern of inhibition than the mAb. By comparison, mocked purified preparations of H19 or purified glycophorin molecules had no effect.

DISCUSSION

The present work defines in humans an additional molecule involved in the rosette phenomenon. We entered upon this study after previously describing a similar molecule on the sheep E surface, that we had termed S14 (21). After immunizing mice with human E, we obtained 2 mAb that block rosettes with human RBC (including

³ Abbreviation used in this paper: AC, accessory cell.

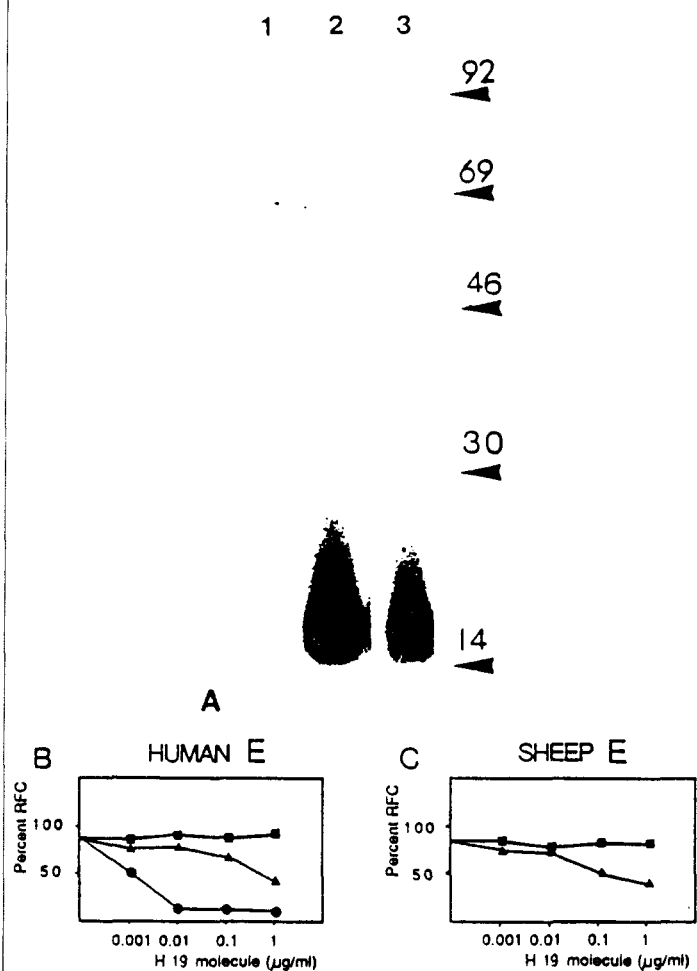


Figure 4. Purification of the H19 molecules and inhibition of rosettes with the purified H19 molecule. H19 was purified by immunoaffinity chromatography from human RBC lysates as described. (A) Autoradiography of SDS-PAGE of the H19 preparation after ^{125}I -labeling; lane 1, a lysate of sheep red cell was run on the anti-H19 column as a negative control; lane 2, immunopurification of a lysate from human red cells; lane 3, the purified material was reimmunoprecipitated with the anti-H19 mAb. (B) Rosettes between thymocytes and human red blood cells in the presence of H19 purified molecules (Δ) glyophorin molecules purified under the same conditions (\blacksquare) and an anti-CD2 mAb (\bullet). (C) The same experiment was performed with rosettes made with sheep red blood cells: H19 purified preparation (Δ) and H19 purified preparation plus anti-H19 mAb (\blacksquare).

rosettes made with autologous cells) and react with a molecule that has a M_r similar, albeit somewhat higher than S14. The human molecule is immunoprecipitated as a single broad band, on gels performed both under reducing and nonreducing conditions, extending from a neat lower limit located in the 19-kDa region and up to the 26-kDa region. Preliminary experiments indicate that this heterogeneity is due to the glucidic moiety. Further work is now in progress to ascertain the equivalence with S14 and the degree of conservation between both species; this includes the sequences of the N-terminal amino-acid residues and the cloning and sequencing of their genes.

Our data show that numerous molecules are involved in rosette formation including LFA-3 (a heavily glycosylated 45 to 66-kDa molecule (34), H19, CD2, and E2 (single 32-kDa chain), that we have recently described (35). We had also detected, on the surface of SRBC, a heavy molecule made of two different polypeptide chains (S110-220) but was not detected on human RBC so far (21). Strikingly, some of these molecules appear to be

present only on the T cell surface: CD2 or E2; others are present on both cell partners for rosettes: LFA-3 and H19. The fact that several molecules are involved in rosette formation should not come as a surprise in view, for instance, of the indications recently collected by several groups showing that CD2 would have several ligands (2, 16, 21). The question is raised, however, as to the exact mechanisms of interactions between CD2 and the molecules located on the RBC surface. Note that the T cell ligand for H19 is also involved in rosetting with SRBC, because purified H19 molecules inhibited rosettes made either with human or sheep rosettes. On the other hand, the question is raised as to the significance of the same molecules being present on both sides of the cell partners for rosettes and whether homophilic interactions might also take place, a property that is not uncommon to adhesion molecules (30). More generally, because the interaction between CD2 and LFA-3 is of a sufficiently high affinity to account for rosette stability (32, 36), it can be speculated as to why so many molecules are involved in rosette formation and whether the complex interactions that must occur would regulate the pattern of T cell adhesion to other cells (13).

Indeed the H19 molecule, like the human LFA-3 molecule or its sheep counterparts (37) is present on nucleated cells, including T cells and monocytes. Like the LFA-3 molecule, the H19 molecule participates to T cell activation. Yet from our experiments, we conclude that both molecules, although obviously mediating adhesion are engaged in different patterns of T cell interaction with other cells. 1) Contrary to anti-LFA-3, we could not evidence a blocking effect of the anti-H19 mAb on the CTL killing of a H19⁺ target cell. This difference is probably not due to the particularities of the anti-H19 mAb we have obtained because the same patterns of inhibition of T cell activation, according to the stimulus used, were seen both with the mAb and the purified molecule. Given that both anti-H19 and anti-LFA-3 mAb fully inhibit rosettes, one sees that these results reflect differential involvement of H19 and LFA-3 in T cell adhesion processes. 2) Our comparative study of the effects of anti-H19 and anti-LFA-3 mAb shows that the inhibition they exert on T cell activation can be accounted for by an effect on the AC molecules only, and we have collected no evidence for an effect on the T cell molecules. Yet, LFA-3 and H19 appear to be engaged in different signals delivered by AC to T cells.

This was evidenced by activating T-PBL with various mitogenic stimuli and by using either live or fixed monocytes (AC), precoated with anti-LFA-3 or anti-H19. Note that these results were observed also with a F(ab')₂ fragment of anti-H19 mAb excluding that at least part of the functional effect might have been due to interaction with the FcR, a possibility that is also excluded by the inhibition observed with the purified molecule.

These data are quite consistent with the known differential characteristics of T cell activation via the CD3 or the CD2 molecules, and in particular with the conclusion that a "hierarchy" of signaling is delivered to T cells by these various stimuli (26, 37-44). Schematically, a CD3 mAb added in the soluble phase delivers a "poor" activation signal, which therefore requires maximal complementary signals from the AC, and cannot be complemented by soluble IL-1 alone contrary to the CD2 signals.

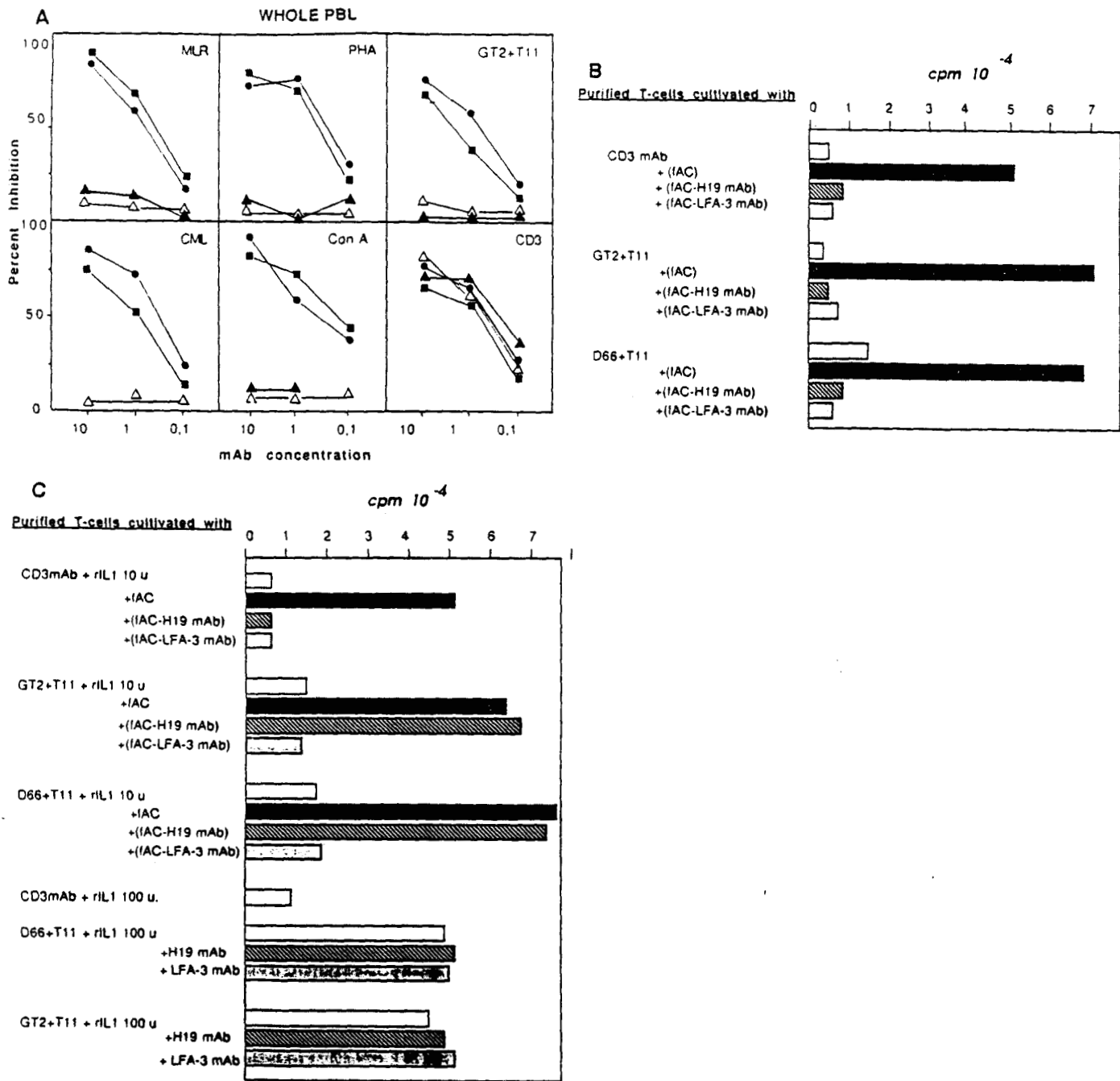


Figure 5. Inhibition of T cell activation by the anti-H19 (clone 1 (γ2a) and its F(ab')₂ fragment mAb: comparison with the effects of anti-LFA-3 mAb. Note that suboptimal amounts of mitogenic CD2 mAb pairs were used to detect an inhibitory effect of anti-H19, which was not found when whole PBMC were used. (A) Increasing amounts of mAb H19, added as a whole Ig (Δ) or as a F(ab')₂ fragment (▲), anti-LFA-3 (■), or CD18 "M232" (●) included as a positive control were added to cultures of whole PBMC, incubated with 1) optimal amounts of allogeneic cells, in terms of [³H]TdR incorporation at day 6, controls gave 150 × 10³ cpm; 2) with suboptimal amounts of PHA (0.1 g/ml), controls gave at day 3, 60 × 10³ cpm; 3) with suboptimal amounts of the CD2 mAb pair GT2 + T11, controls gave at day 4, 80 × 10³ cpm; no inhibition was seen when whole PBMC were stimulated by the CD2 mAb pair D66 + T11, (not shown); 4) the H19 mAb were also incubated with the mixture of effector cytotoxic T cells and their specific, ⁵¹Cr-labeled target cells (PHA blasts from the donor of stimulatory cells) in a 4-h assay no inhibition could be detected; 5) with suboptimal amounts of Con A (1 g/ml), controls gave at day 3, 50 × 10³ cpm; 6) with optimal amounts of a CD3 mAb "T3," controls gave at day 4, 55 × 10³ cpm. (B) T cells were extensively purified from peripheral blood, so that no response was observed when they were cultivated with PHA. Purified autologous monocytes were incubated with anti-H19 or anti-LFA-3 mAb as indicated and subsequently fixed by mild paraformaldehyde treatment (IAC-H19 mAb and IAC-LFA-3 mAb, respectively). Both cell types were cultivated together in the presence of optimal amounts of CD3 or CD2 mAb pair D66 + T11, or GT2 + T11, [³H]TdR incorporation was measured by day 3 (CD3) or by day 4 (CD2 stimulation). Note also that controls in these experiments demonstrated no detectable elution of the mAb from the accessory cell surface, either under immunofluorescence or in terms of functional interference with T cell proliferation. (C) Purified T cells were cultivated with 10 or 100 U of rIL-1 (generous gift from the Glaxo research group) alone with stimulatory mAb in the presence or not of fixed autologous monocytes; IL-1 was added at the initiation of the cultures.

Mitogenic lectins and allogeneic cells would directly deliver to T cells more signals that require from AC the LFA-3, but not the H19 molecules. In brief, we conclude from our experiments that the LFA-3 molecule from AC is required for the delivery of a complementary signal

that is necessary to complement any mitogenic signal, even though soluble IL-1 is in reasonable quantities (10 U/ml), whereas the H19 molecule is required for the delivery of a signal that is "always" necessary upon stimulation via CD3, and required only, upon stimulation via

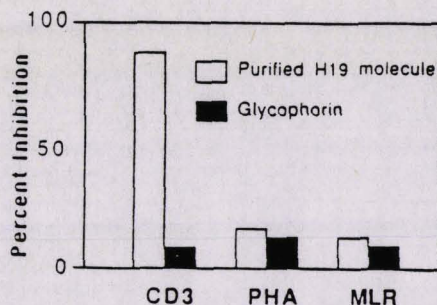


Figure 6. Inhibition of T cell activation by purified H19 molecules. An aliquot of 0.1 g of the purified H19 preparation has been added per ml of culture medium, and PBL were stimulated by a CD3 mAb, PHA, or allogeneic cells under the conditions described in Figure 5A. Control cultures were performed with the same amount of a purified preparation of glycophorin or with the same volume of a mocked purification of H19.

CD2, when no soluble IL-1 is available. Regarding the stimulation via CD2, our conclusion is consistent with the previous observation that SRBC induce T cell activation with submitogenic amounts of a CD2 pair of mAb (T11₂ + T11₃) (2), an effect which can also be produced by the purified LFA-3 molecule (16). Regarding the stimulation via CD3, our conclusion also fits with the observation that mouse cells expressing human LFA-3 can induce significant [³H]TdR incorporation by purified T-PBL in cooperation with a CD3 mAb (17). We show here that maximal proliferation require an additional interaction involving H19. If one sticks to the view that LFA-3 would be the unique T cell ligand for CD2, one must admit that the CD2 molecule is required for activation by a CD3 mAb. This underlines the "functional" interactions occurring between both molecules (45-49).

More generally, our data contributes to identify an array of surface molecules (50, 51) involved in the cooperation of T cell with accessory cells to trigger and to control T cell activation.

Acknowledgments. We thank Dr. Bourel for providing CD3 mAb X35-7, Dr. B. F. Haynes for providing anti-LFA-3, and Dr. A. Shaw (Glaxo Co.) for the generous gift of interleukins.

REFERENCES

- Springer, T. A., M. L. Dustin, T. A. Kishimoto, and S. D. Martin. 1987. The lymphocyte function-associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 5:223.
- Hünig, T., G. Tiefenthaler, K. H. Meyer zum Büschenfelde, and S. C. Meuer. 1987. Alternative pathway activation of T cells by binding of CD2 to its cell-surface ligand. *Nature* 326:298.
- Scheffel, J. W., and S. J. Schwartz. 1982. Inhibition of autologous rosette formation by monoclonal antibody to the sheep erythrocyte receptor. *J. Immunol.* 128:1930.
- Selvaraj, P., M. L. Plunkett, M. Dustin, M. E. Sanders, S. Shaw, and T. A. Springer. 1987. The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326:400.
- Plunkett, M. L., M. E. Sanders, P. Selvaraj, M. L. Dustin, and T. A. Springer. 1987. Rosetting of activated human T lymphocytes with autologous erythrocytes. Definition of the receptor and ligand molecules as CD2 and lymphocyte function associated antigen 3 (LFA-3). *J. Exp. Med.* 165:664.
- Dustin, M. L., M. E. Sanders, S. Shaw, and T. A. Springer. 1987. Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J. Exp. Med.* 165:667.
- Takai, Y., M. L. Reed, S. J. Burakoff, and S. H. Herrmann. 1987. Direct evidence for a receptor-ligand interaction between the T-cell surface antigen CD2 and lymphocyte-function-associated antigen 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6864.
- Makgoba, M. W., S. Shaw, E. A. Gugel, and M. E. Sanders. 1987. Human T cell rosetting is mediated by LFA-3 on autologous erythrocytes. *J. Immunol.* 138:3587.
- Krensky, A. M., F. Sanchez-Madrid, E. Robbins, J. A. Nagy, T. A. Springer, and S. J. Burakoff. 1983. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3: cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.* 131:611.
- Vollger, L. W., D. T. Tuck, T. A. Springer, B. F. Haynes, and K. H. Singer. 1987. Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LFA-3 antigens. *J. Immunol.* 138:358.
- Denning, S. M., D. T. Tuck, L. W. Vollger, T. A. Springer, K. H. Singer, and B. F. Haynes. 1987. Monoclonal antibodies to CD2 and lymphocyte function-associated antigen 3 inhibit human thymic epithelial cell-dependent mature thymocyte activation. *J. Immunol.* 139:2573.
- Shaw, S., G. E. G. Luce, R. Quinones, R. E. Gress, T. A. Springer, and M. E. Sanders. 1986. Two antigen-independent adhesion pathways used by human cytotoxic T-cell clones. *Nature* 323:262.
- Shaw, S., and G. E. Ginther Luce. 1987. The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA-3 pathways of antigen-independent human T cell adhesion. *J. Immunol.* 139:1037.
- Meuer, S. C., R. E. Hussey, M. Fabbri, D. Fox, O. Acuto, K. A. Fitzgerald, J. C. Hodgdon, J. F. Potentis, S. F. Schlossman, and E. L. Reinherz. 1984. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kD T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36:897.
- Bernard, A., P. Brottier, E. Georget, V. Lepage, and L. Boumsell. 1986. The epitopic dissection of the CD2 defined molecule: relationship of the Second Workshop antibodies in terms of reactivities with leucocytes, rosette blocking properties, inductions of positive modulation of the molecule and triggering T-cell activation. In *Leucocyte Typing II*, E. L. Reinherz, B. F. Haynes, L. M. Nadler, I. D. Bernstein, eds. Springer-Verlag, New York, p. 53.
- Tiefenthaler, G., T. Hünig, M. L. Dustin, T. A. Springer, and S. C. Meuer. 1987. Purified lymphocyte function-associated antigen-3 and T11 target structure are active in CD2-mediated T cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 17:1847.
- Bierer, B. E., J. Barbosa, S. Herrmann, and S. J. Burakoff. 1988. Interaction of CD2 with its ligand, LFA-3, in human T cell proliferation. *J. Immunol.* 140:3358.
- Hünig, T. 1985. The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. Identification and partial characterization using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 162:890.
- Hünig, T., R. Mitnacht, G. Tiefenthaler, C. Köhler, and M. Miyasaka. 1986. T11TS, the cell surface molecule binding to the "erythrocyte receptor" of T lymphocytes: cellular distribution, purification to homogeneity and biochemical properties. *Eur. J. Immunol.* 16:1615.
- Tiefenthaler, G., M. L. Dustin, T. A. Springer, and T. Hünig. 1987. Serologic cross-reactivity of T11 target structure and lymphocyte function-associated antigen 3. *J. Immunol.* 139:2696.
- Bernard A., H. C. Tran, and L. Boumsell. 1987. Three different erythrocyte surface molecules are required for spontaneous T-cell rosette formation. *J. Immunol.* 139:18.
- Boumsell, L., and A. Bernard. 1980. High efficiency of Biozzi's high responder strains of mice in the generation of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 38:225.
- Parham, P. 1984. Changes in conformation with loss of alloantigenic determinants of a histocompatibility antigen (HLA-B7) induced by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132:2975.
- Mancini, G., A. O. Carbonara, and J. F. Heremans. 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235.
- Parham, P. 1983. On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from Balb/c mice. *J. Immunol.* 131:2895.
- Huet, S., H. Wakasugi, G. Sterkers, J. Gilmour, T. Tursz, L. Boumsell, and A. Bernard. 1986. T-cell activation via CD2 T_gp50. The role of accessory cells in activating resting T-cells via CD2. *J. Immunol.* 137:1420.
- Bernard, A., C. Gelin, B. Raynal, D. Pham, C. Gosse, and L. Boumsell. 1982. Phenomenon of human T-cells rosetting with sheep erythrocytes analyzed with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 155:1317.
- Parham, P., C. J. Barnstable, and W. F. Bodmer. 1979. Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C antigens. *J. Immunol.* 123:342.
- Amiot, M., A. Bernard, H. C. Tran, G. Leca, J. Kanellopoulos, and L. Boumsell. 1986. The human cell surface glycoprotein complex (gp 120.200) recognized by monoclonal antibody K20 is a component binding to phytohemagglutinin (PHA) on T-cell. *Scand. J. Immunol.* 136:1752.
- Edelman, G. M. 1985. Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 54:135.
- Tiele, D. L., M. Kurosaka, and P. E. Lipsky. 1983. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent L-leucine methylester. *J. Immunol.* 131:2282.
- Selvaraj, P., M. L. Dustin, R. Mitnacht, T. Hünig, T. A. Springer, and M. L. Plunkett. 1987. Rosetting of human T lymphocytes with

- sheep and human erythrocytes. Comparison of human and sheep ligand binding using purified E receptor. *J. Immunol.* 138:2690.
33. Cobbold, S., G. Hale, and H. Waldmann. 1987. Non-lineage, LFA-1 family, and leucocyte common antigens: new and previously defined clusters. In *Leucocyte Typing III*. A McMichael, ed. Oxford University Press, Oxford, p. 788.
 34. Wallner, B. P., A. Z. Frey, R. Tizard, R. J. Mattaliano, C. Hession, M. E. Sanders, M. L. Dustin, and T. A. Springer. 1987. Primary structure of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3). The ligand of the T lymphocyte CD2 glycoprotein. *J. Exp. Med.* 166:923.
 35. Bernard, A., F. Aubrit, B. Raynal, D. Pham, and L. Boumsell. 1988. A T cell surface molecule different from CD2 is involved in spontaneous rosette formation with erythrocytes. *J. Immunol.* 140:1802.
 36. Takai, Y., M. L. Reed, S. J. Burakoff, and S. H. Herrmann. 1987. Direct evidence for a receptor-ligand interaction between the T-cell surface antigen CD2 and lymphocyte-function associated antigen 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:6864.
 37. Hünig, T. R. 1986. The ligand of the erythrocyte receptor of T lymphocytes: expression on white blood cells and possible involvement in T cell activation. *J. Immunol.* 136:2103.
 38. Huet, S., L. Boumsell, B. Raynal, L. Degos, J. Dausset, and A. Bernard. 1987. Role in T-cell activation for HLA-class I molecules from accessory cells. Further distinction between activation signals delivered to T-cells via CD2 and CD3 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7222.
 39. Huet, S., L. Boumsell, J. Dausset, L. Degos, and A. Bernard. 1988. The required interactions between monocytes and T-PBL upon activation via CD2 or CD3. Role of the HLA class I molecules from accessory cells, and the differential response of T-PBL subsets. *Eur. J. Immunol.* 18:1187.
 40. Holter, W., G. F. Fischer, O. Majdic, H. Stockinger, and W. Knapp. 1986. T cell stimulation via the erythrocyte receptor. Synergism between monoclonal antibodies and phorbol myristate acetate without changes of free cytoplasmic CA^{2+} levels. *J. Exp. Med.* 163:654.
 41. June, C. H., J. A. Ledbetter, P. S. Rabinovitch, P. J. Martin, P. G. Beatty, and J. A. Hansen. 1986. Distinct patterns of transmembrane calcium flux and intracellular calcium mobilization after differentiation antigen cluster 2 (E rosette receptor) or 3 (T3) stimulation of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 77:1224.
 42. Shipp, M. A., and E. L. Reinherz. 1987. Differential expression of nuclear proto-oncogenes in T cells triggered with mitogenic and nonmitogenic T3 and T11 activation signals. *J. Immunol.* 139:2143.
 43. Yssel, H., J. P. Aubry, R. de Waal Malefijt, J. E. de Vries, and H. Spits. 1987. Regulation by anti-CD2 monoclonal antibody of the activation of a human T cell clone induced by anti-CD3 or anti-T cell receptor antibodies. *J. Immunol.* 139:2850.
 44. Hu, J., C. Vaquero, S. Huet, A. Bernard, and G. Sterkers. 1987. Interleukin 2 up-regulates its own production. *J. Immunol.* 139:4109.
 45. Yang, S. Y., S. Chouaib, and B. Dupont. 1986. A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 sheep erythrocyte receptor determinants. *J. Immunol.* 137:1097.
 46. Fox, D. A., S. F. Schlossman, and E. L. Reinherz. 1986. Regulation of the alternative pathway of T cell activation by anti-T3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 136:1945.
 47. Lamb, J. R., E. D. Zanders, W. Sewell, M. J. Crumpton, M. Feldmann, and M. J. Owen. 1987. Antigen-specific T cell unresponsiveness in cloned helper T cells mediated via the CD2 or CD3/Ti receptor pathways. *Eur. J. Immunol.* 17:1641.
 48. Breitmeyer, J. B., J. F. Daley, H. B. Levine, and S. F. Schlossman. 1987. The T11 (CD2) molecule is functionally linked to the T3/Ti T cell receptor in the majority of T cells. *J. Immunol.* 139:2899.
 49. Holter, W., O. Majdic, H. Stockinger, B. H. Howard, and W. Knapp. 1988. Regulation of the CD2 alternative pathway of T cell activation by CD3. Evidence for heterologous desensitization. *J. Immunol.* 140:1043.
 50. Williams, J. M., B. J. Ransil, H. M. Shapiro, and T. B. Strom. 1984. Accessory cell requirement for activation antigen expression and cell cycle progression by human T lymphocytes. *J. Immunol.* 133:2986.
 51. Davis, L., and P. E. Lipsky. 1985. Signals involved in T cell activation. I. Phorbol esters enhance responsiveness but cannot replace intact accessory cells in the induction of mitogen-stimulated T cell proliferation. *J. Immunol.* 135:2946.

LA MOLECULE CD44

C] CD44, une molécule impliquée dans le homing, dans des systèmes d'adhérence et dans l'activation des lymphocytes T

La molécule CD44 a été impliquée dans de nombreuses fonctions liées au système immunitaire. Elle s'est appelée Pgp-1, p80, Hermes, ECM-III et HUTCH-1 avant que l'identité de ces différentes molécules soit acceptée. On lui a reconnu une fonction dans le homing et dans l'adhésion cellulaire soit avec d'autres cellules, soit avec la matrice protéique extra cellulaire. Finalement comme d'autres molécules d'adhésion (CD2, VLA-4, LFA-1) elle est impliquée dans la régulation de l'activation des lymphocytes T.

• 1. La migration des lymphocytes, les récepteurs du homing

Bien que les tissus lymphoïdes soient dispersés au sein de l'organisme ils sont reliés entre-eux par deux réseaux vasculaires : le système sanguin et le système lymphatique. Les cellules du système immunitaire sont mobiles et circulent à l'intérieur de l'organisme, quittant le sang pour un organe lymphoïde et revenant ensuite dans le sang (90,91). Ce transit des cellules au sein des différents compartiments du système immunitaire permet l'homogénéisation de la réponse immune.

• 1.1. La migration des cellules se fait de façon sélective

Tous les lymphocytes matures au repos de l'organisme peuvent circuler et atteindre n'importe quel organe lymphoïde. Cependant cette circulation des cellules ne se fait pas au hasard et certaines sous-populations cellulaires se dirigent préférentiellement vers l'une des nombreuses zones lymphoïdes de l'organisme. Ainsi les lymphocytes B migrent préférentiellement dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, alors que les lymphocytes T migrent surtout dans les ganglions lymphoïdes périphériques (92). Cette différence se retrouve également parmi différentes sous-populations cellulaires T (93).

Si la migration des lymphocytes au repos se déroule au sein de tout l'organisme, ce n'est pas le cas des cellules effectrices ni certainement des cellules mémoires spécifiques d'un antigène. Une fois activée dans un endroit précis de l'organisme, les cellules retourneront spécifiquement dans les zones où s'est déroulée la reconnaissance antigénique. Par exemple, des

lymphocytes activés prélevés dans les ganglions périphériques retournent principalement dans des ganglions périphériques et pas dans les plaques de Peyer et des lymphocytes prélevés dans l'épithélium de l'estomac se dirigent exclusivement dans les organes lymphoïdes associé au système digestif comme les plaques de Peyer (94). Ces résultats ont conduit l'équipe de Butcher E.C. à formuler un modèle où il existerait à la surface des lymphocytes deux récepteurs apparentés, l'un se fixerait dans les plaques de Peyer et l'autre serait spécifique des ganglions périphériques (cf infra).

•1.2. La reconnaissance des cellules endothéliales.

Pour pénétrer à l'intérieur des tissus lymphoïdes, les lymphocytes présents dans le sang doivent franchir l'endothélium des vaisseaux (sauf dans la rate où les artérioles se terminent dans le parenchyme n'empêchant pas l'écoulement des cellules). Ce phénomène d'extravasation se déroule au niveau de zones spécialisées des veinules post capillaires présentant un endothélium formé de cellules très hautes d'où le nom donné par les anglo-saxons à ces zones : "High Endothelial Venules" ou "HEV" (nom que nous conserverons par simplification) (95). Ces veinules servent à fixer les lymphocytes et leur permettent de franchir la barrière endothéliale. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les lymphocytes circulants se fixaient presque exclusivement au niveau des HEV. Ces études ont permis de montrer que les HEV étaient les portes d'entrée des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes et suggèrent que les différences dans le choix d'un organe lors de la recirculation des cellules est due à une affinité plus grande pour un type de HEV (96). Suivant les organes, les cellules de l'endothélium formant les HEV doivent exprimer à leur surface des ligands différents (les addressins) reconnus par des récepteurs présents à la surface des lymphocytes et appelés récepteurs du "homing".

•1.3. Les récepteurs du homing

Des études utilisant des anticorps monoclonaux ont permis d'identifier des molécules présentes à la surface des lymphocytes et interagissant avec les cellules endothéliales des vaisseaux (cf table).

espèces	anticorps	specificité	poids moléculaire	inhibition de l'adhésion	references
Souris	MEL-14	ganglions périphériques	80-90 kDa	>90%	97
	HBA-35	Plaques de Peyer	110/140 kDa	>90%	98
Rat	A.11	ganglions périphériques	135-63-40 kDa	>90%	96,99
	1.B.2	Plaques de Peyer	80 kDa	>90%	96
Homme	Hermes1	ubiquitaire	80-90 kDa	0	100
	Hermes3	Plaques de Peyer	80-90 kDa	>90%	100
	3.A.7	ganglions périphériques	?	>90%	96
	2.E11 et 4.C.6	ganglions périphériques	?	0	96

Chez la souris, l'anticorps MEL-14 permet de définir une molécule d'environ 90 kDa, présente uniquement sur les lymphocytes, et qui se fixe exclusivement sur les HEV des ganglions périphériques. Chez l'homme, les anticorps de la famille Hermes permettent de définir une molécule de 90 kDa présente à la surface de nombreuses cellules et impliquée dans la fixation des lymphocytes sur les veinules post-capillaires. De plus les anticorps Hermes1 et MEL-14 sont crossréactifs ce qui laissait penser que ces deux molécules étaient voisines. En fait ces deux molécules, à présent clonées et séquencées sont très différentes (101). La molécule humaine (en fait la molécule CD44) présente une homologie avec les protéines fixant le cartilage (102,103) alors que la molécule reconnue par MEL-14 fait partie de la famille des LEC-CAM (pour lectin-epidermal growth factor-complement-Cell Adhesion Molecule) qui sont des molécules présentant 3 domaines : un domaine lectine (la molécule MEL-14 fixe le mannose-6-phosphate), un domaine homologue à l'EGF et un domaine d'homologie avec les protéines capables de fixer le complément notamment C3 et C4 (104).

Récemment, la description de la fixation de la molécule VLA-4 (cf infra) sur les HEV des plaques de Peyer de la souris apporte encore un élément compliquant le schéma simplificateur de 2 récepteurs du homing

apparentés se fixant soit sur les veinules des ganglions mésentériques soit sur les veinules des ganglions périphériques. On s'oriente à présent vers un schéma où des molécules présentant des potentialités multiples (comme VLA-4, LFA-1 et CD44) sont utilisées pour diriger la circulation lymphocytaire au sein de l'organisme.

•2. La molécule CD44, une molécule aux potentialités multiples.

•2.1. Les différentes recherches sur la molécule CD44

La molécule CD44 a été décrite pour la première fois par Dalchau et coll.(105) en 1980 comme une molécule humaine reconnue par l'anticorps F10-44-2. Cette molécule était présente sur les lymphocytes T, les granulocytes, certaines cellules du cerveau et les thymocytes corticaux (105,106). Le gène codant pour cette molécule a ensuite été placé sur le chromosome 11(107).

En 1981, une glycoprotéine de surface de 80 kDa présente sur les cellules 3T3 de souris mais aussi sur les macrophages et les granulocytes est appelée par Hughes et ses collaborateurs (108-110) Pgp-1 (pour phagocytic glycoprotein -1).

En 1982, cette molécule fut identifiée par Trowbridge et al. sur les lymphocytes et sur certains thymocytes murins (111-114). Elle prit le nom de Ly24 et il fut possible d'identifier chez la souris deux allèles nommés Ly24-1 et Ly24-2. La même année, Carter décrit une molécule de 90 kDa à la surface des fibroblastes humains et associée au cytosquelette (115,116). Cette molécule est également capable de fixer le collagène de type I et de type VI ainsi que la fibronectine. Cette protéine fut appelée ECM-III (pour Extracellular Matrix Receptor type III).

En 1983, B. Haynes et coll. décrivent 2 anticorps monoclonaux appelés A1G3 et A3D8 qui reconnaissent à la surface des globules rouges et des lymphocytes T humains une molécule de 80 kDa. L'expression de cette molécule sur les érythrocytes et sur 30% des monocytes est régulée par le gène autosomal dominant de l'inhibiteur du Lutheran. D'autre part comme la molécule reconnue par l'anticorps F10-44-2, cette molécule est présente à la surface des thymocytes corticaux et son gène se situe sur le chromosome 11 (117-119).

Ensuite Letarte et Telen (120,121) montrent que cette molécule est également présente à la surface des lymphocytes B et que les anticorps A3D8 et A1G3 se fixent sur les lymphocytes B. En fait seul, parmi les lymphocytes B, ceux présent dans les centres germinatifs des ganglions ne sont pas marqués par ces anticorps.

En 1986 Jalkanen décrit la série des anticorps Hermes qui reconnaissent un récepteur du homing de 80 kDa (122,123) et Gallatin décrit une molécule p90 nommée HUTCH-1 qui se fixe sur les endothélium et dont l'expression augmente à la surface des lymphocytes T après activation.(124)

Finalement à la 3^o Workshop sur les antigènes de différenciation leucocytaire cette molécule pris le nom de CD44 (125).

• 2.2. Structure de la molécule CD44

La molécule CD44 possède un corps proteique de 37 kDa sur lequel se fixent des polysaccharides fixés sur des résidus N ou O qui donnent à la molécule son poids moléculaire final de 80-90 kDa. Cette molécule est également capable de fixer des chondroitines sulfate ce qui donne une forme de 180-200 kDa. Le gène de la molécule CD44 a été cloné et séquencé par deux équipe différentes (102,103). La séquence polypeptidique montre un partie intracytoplasmique de 23 acides aminés. Juste au dessus de cette partie, un domaine de 150 AA présente de nombreux site de glycosylation tant sur les résidus O (Sérines et Thréonines) que sur des résidus N (motif Sérine-Glycine) qui sont également les sites de fixation des chaines chondroitin sulfate. La partie N terminale de la molécule CD44 présente des homologues avec les proteines fixant le cartilage du poulet et du rat. Ce domaine servirait aux interactions proteine-acide hyaluronique ou à la fixation du collagène.

• 2.3. Les rôles de la molécules CD44

Nom de la molécule ou de l'anticorps	Fonction	Références
F10-44-2, CD44	Marqueur de maturation T, présent sur de nombreuses cellules et dans le plasma, molécule porteuse des antigènes du groupe sanguin luthéran	96,105
Pgp-1	Molécule présente sur les monocytes et les fibroblastes et servant à la diapédèse. Exprimée sur les précurseurs des cellules T	108,112
ECM-III	Molécule de surface associée au cytosquelette et fixant le collagène et la fibronectine	115,116
p80, A1G3, A3D8	Molécule présente sur les érythrocytes et les monocytes dont l'expression est régulée par l'inhibiteur du Luthéran. Marqueur de différenciation thymique. Molécule servant à l'adhésion et l'activation des cellules T	117- 119,126
p80	molécule de cellule B présente sur d'autres cellules	121,122
Hermes, récepteur du homing	Molécule servant à la fixation des lymphocytes sur les HEV	122,123
HUTCH-1	Molécule servant à la fixation des lymphocytes sur les cellules endothéliales surexprimée lors de l'activation	124,127
CD44	Molécule servant à l'adhésion et l'activation des cellules T	126,128
CD44	Molécule servant à l'adhésion et l'activation des cellules T	47

Comme on le voit sur ce tableau, les rôles de la molécule CD44 sont multiples. Comme molécule d'adhésion, elle est capable de se fixer aussi bien sur les protéines de la matrice extra-cellulaire comme le collagène ou la

fibronectine, que sur les cellules endothéliales des vaisseaux au niveau de molécules appelées addressines (129). D'autre part comme nous l'avons montré, ainsi que d'autres équipes, la molécule CD44 est impliquée dans l'activation des lymphocytes T

•3. La molécule CD44 et l'activation des cellules T **-résumé de l'article 2**

Lors de nos recherches d'isolement d'un anticorps monoclonal dirigé contre les globules rouges et permettant de moduler l'activation des lymphocytes T, nous avons isolé un anticorps monoclonal, nommé P245, dirigé contre une molécule de 90 kDa présente à la surface des erythrocytes, des lymphocytes T et B, des thymocytes matures, des monocytes et d'une partie des granulocytes. Des expériences de compétition de fixation et d'immunoprécipitation séquentielle nous ont permis de montrer que cet anticorps se fixait sur la même molécule que les anticorps A1G3 et A3D8 décrits par B.F. Haynes et coll. et reconnaissant une molécule pouvant servir de marqueur de différenciation thymocytaire. Lors de nos études de marquages immunohistochimiques de coupe de thymus, nous nous sommes rendu compte de la similitude des marquages obtenus avec cet anticorps avec ceux décrits pour l'anticorps MEL-14 qui chez la souris reconnaît un récepteur du homing. Et en effet, cet anticorps est capable d'inhiber la fixation des lymphocytes sur les veinules post-capillaires des ganglions périphériques humains. L'ensemble de ces résultats nous permettait de définir cet anticorps comme reconnaissant le récepteur du homing humain.

A cette époque, des expériences parallèles réalisées entre les laboratoires de B. F. Haynes (qui travaillait sur les anticorps A1G3 et A3D8) et de E.C. Butcher (qui travaillait sur le récepteur du homing humain) ont montré que ces deux molécules étaient bien semblables et qu'il s'agissait de la molécule CD44 décrite lors de la III^e workshop sur les antigènes de différenciation.

Il nous était encore possible d'étudier le rôle du récepteur du "homing" dans l'activation des lymphocytes T. Nous savions que le nombre de récepteurs du "homing" présents à la surface des lymphocytes T

augmentait au cours de l'activation (130). Mais le rôle de cette molécule dans l'activation des lymphocytes T n'avait jamais été décrit.

Dans un premier temps, nous avons testé l'action de l'anticorps P245, sur l'incorporation de thymidine tritiée par des lymphocytes issus du sang périphérique stimulé par :

- des doses submitogéniques de lectines (PHA, ConA)
- des cellules allogéniques
- des anticorps CD3
- différentes paires mitogéniques d'anticorps CD2

La stimulation par les lectines, les cellules allogéniques et les anticorps CD3 solubles n'est pas modifiée. Par contre, lorsque les lymphocytes sont activés par différentes paires d'anticorps CD2 ou des anticorps CD3 fixés au fond des plaques de culture, l'incorporation de thymidine par les cellules est fortement augmentée (3 à 5 fois).

Cette molécule est exprimée à la fois sur les lymphocytes T et sur les monocytes. Nous avons donc testé l'action des anticorps P245 sur les lymphocytes T purifiés. Sur ces cellules, ces anticorps sont capables, en conjonction avec des anticorps CD2 ou des anticorps CD3 fixés, de déclencher la prolifération des lymphocytes T. Les anticorps P245 n'ayant aucun effet seuls. Cette augmentation de prolifération est induite par une expression du récepteur de l'IL2 et par une synthèse d'IL2.

L'action des anticorps CD44 ressemble beaucoup à celle d'anticorps CD28. Pourtant les signaux transmis à la cellule par ces deux molécules semblent différents. En effet :

-Les anticorps CD44, contrairement aux anticorps CD28, sont incapables de compléter un signal délivré par les anticorps CD3 solubles, les lectines, ou le PMA

-Les anticorps CD28, contrairement aux anticorps CD44, sont capables d'induire la prolifération de thymocytes matures. Les deux molécules sont pourtant exprimées toute deux à la surface de ces cellules.

-Les anticorps CD44 sont efficaces même sous la forme de fragments Fab alors que les anticorps CD28 doivent se présenter sous la forme de fragments divalents

-Les anticorps CD28 et CD44 ont un effet synergique très important pour induire la prolifération des lymphocytes T.

L'ensemble de ces résultats montre donc que des anticorps dirigés contre la molécule CD44 sont capables de compléter un signal d'activation fourni par des anticorps CD3 ou des paires d'anticorps CD2, et

que le signal fourni par les anticorps CD44 est différent de celui fourni par les anticorps CD28

On peut donc penser que la fixation des lymphocytes au niveau des veinules post-capillaires induit un signal de préactivation qui prépare les cellules à un stimulus ultérieur fourni à l'intérieur des ganglions. A l'inverse, il est possible que des cellules préactivées dans le sang périphérique reçoivent un signal complémentaire lors de leur fixation au niveau des HEV. Une troisième possibilité serait que la molécule CD44 qui présente de nombreuses interactions moléculaires différentes possède un ligand à la surface des cellules accessoires (ligand encore inconnu) et que l'interaction de la molécule CD44 avec son ligand favorise l'activation des cellules T.

Ces travaux ont été depuis confirmés par deux équipes différentes qui apportent les mêmes résultats (126,128). De plus Denning et coll. (131) ont montré que les anticorps CD44 étaient capables d'induire la production d'IL1 par les monocytes montrant que le rôle de cette molécule dans l'activation des cellules n'est pas restreint aux lymphocytes T.

CD44 CONTRIBUTES TO T CELL ACTIVATION¹

STEPHANE HUET,* HERVE GROUX,* BERNARD CAILLOU,[†] HELENE VALENTIN,* ANNE-MARIE PRIEUR,[‡] AND ALAIN BERNARD*

From the *Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs de l'Enfant, †Department of Anatomopathology, Institut Gustave-Roussy 94805 Villejuif Cedex, and ‡INSERM U132, Hôpital des Enfants-Malades, 75015 Paris, France

We demonstrate here that the CD44 molecule, which mediates lymphocyte adhesion to high endothelial venules (HEV), is also involved in the delivery of an activation signal to the T cell. We have produced a CD44 mAb (H90) which is able to block the binding of lymphocytes to high endothelial venules. H90 had no effect on [³H]TdR incorporation of whole PBL stimulated by lectins, allogeneic cells, or CD3 mAb in the soluble phase; in contrast, it strongly increased [³H]TdR incorporation of PBL stimulated by CD2 pairs of mAb or by CD3 mAb linked to the plastic culture plates. When purified T cells were used, H90 mAb could efficiently induce them to proliferate after a primary signal of activation delivered via cross-linked CD3 or via CD2, an effect mediated by IL-2 synthesis and IL-2R expression. Thus, the effect of H90 mAb resembles the mitogenic effect of CD28 "9.3" mAb. However, several results show that CD28 and CD44 mediate different signals to the T cells: i) in contrast to CD28 mAb, CD44 mAb cannot complement the signal delivered by a soluble CD3 mAb, lectins, or PMA; ii) CD44 mAb, at the difference of CD28 mAb, cannot induce CD3⁺ thymocytes to proliferate in conjunction with a first signal provided via cross-linked CD3 or via CD2; iii) F(ab) fragments of H90 were efficient, whereas divalent fragments of CD28 9.3 mAb are required to produce activation signals; and iv) CD44 and CD28 mAb produce a very strong synergistic effect on T cell proliferation. These results fit with previous ones showing that endothelial cells can play the role of accessory cell in T cell activation and that a hierarchy of signaling can be delivered to T cells via CD3 and CD2.

The circulation and migration of lymphocytes is an essential aspect of their function. Lymphocytes migrate from blood to lymph nodes by binding HEV.² Specific interaction between lymphocytes and thick endothelial cells from postcapillary venules is mediated by a series of lymphocyte surface adhesion molecules (1-8). In humans, several mAb were shown to block lymphocyte binding to HEV and to react with a single-chain, 90-kDa

molecule defined by CD44 (6, 8). Despite observations that lymphocyte homing receptor expression was up- or down-regulated during lymphocyte differentiation both in man and in mouse (3) or upon T cell activation in the mouse (2), no direct role was assigned to these molecules in the transmission of a signal regulating T cell proliferation. In this report, we have used a new mAb, designated "H90," which reacts with the CD44 molecule. H90 mAb can block the binding of lymphocytes to HEV. Furthermore, H90 mAb, in synergy with a CD3 mAb or a pair of CD2 mAb, can induce highly purified T cells to proliferate.

MATERIALS AND METHODS

mAb, cell preparations, and cultures. The H90 hybridoma cell line was a product of the fusion of P3 NS1/1 Ag 4-1 mouse myeloma cells with splenocytes from a Biozzi's high responder mouse immunized by i.p. injection of human RBC. mAb H90 was shown to be an IgG1 by immunodiffusion with subclass-specific antisera (Littor Bionetics, Kensington, MD). F(ab) fragments of H90 mAb were prepared from HPLC-purified mAb by 2 h papain digestion by using a protocol previously described (9).

The CD2 (GT2, T11, D66, VIT13) and CD3 (X35.7) mAb used in this study have been described previously (10). The CD28 (9.3) mAb was kindly provided by Dr John Hansen (11). Coating of CD3 mAb on culture plates was performed as follows. mAb were diluted at 1 µg/ml in sodium carbonate buffer (0.05 M, pH 9.6). The solution (0.1 ml/well) was dispensed in a 96-well, flat-bottomed culture plate (Nunc, Roskilde, Denmark). Plates were incubated for 2 h at 37°C followed by 18 h at 4°C; each well was washed twice with PBS-Tween and, finally, with RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) + 10% FCS.

T cells were purified from peripheral blood by using a four-step procedure described previously (10). Briefly, after 1 h adherence of PBL to plastic Petri dishes, nonadherent cells were treated with carbonyl iron for 1 h at 37°C. After passage over a magnet, cells were incubated with L-leucine methyl ester (2.5 mM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) as described (10). Finally, residual monocytes were eliminated by two cycles of treatment with non-toxic rabbit C and an anti-HLA-DR mAb under conditions described elsewhere (10). This led to preparations of T cells unresponsive to PHA. PBL were cultured in RPMI 1640 + 10% FCS at 5 × 10⁴ cells/well and thymocytes at 5 × 10⁵ cells/well in a final 200-µl vol. [³H]TdR incorporation was measured during the final 18-h incubation of a 4-day stimulation period. Thymocytes were obtained from 2- to 10-year-old children after cardiac surgery. Thymocyte subpopulations were sorted by using appropriate mAb plus rabbit C' (12). CD1⁻CD5⁺ thymocytes were purified after treating whole thymocytes with a CD1 "D47" mAb plus rabbit C' as described (12). The purity of the CD1⁻CD5⁺ thymocyte subpopulation obtained was > 95% as determined by immunofluorescence. rIL-2 was obtained from GLAXO (Geneva, Switzerland). IL-2 activity in 24-h cell culture supernatants was measured by using the CTLL-2 line as previously described (10).

Measurement of IL-2R expression. CD25 expression was measured on T cells by cytofluorometry. After 3 days of culture, 5 × 10⁴ stimulated T cells were labeled for 30 min at 4°C with a directly fluoresceinated CD25 mAb (10T14) (Immunotech, Marseille, France). Fluorescence was detected with an ORTHO 50H cytofluorometer.

Received for publication December 19, 1988.

Accepted for publication May 4, 1989.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer, INSERM Grant (CRE 873005), Electricité de France Grant B00L18, Institut Gustave-Roussy Grant 87D6, and the Fondation de France.

² Abbreviation used in this paper: HEV, high endothelial venule.

RESULTS AND DISCUSSION

The H90 mAb reacts with the human lymphocyte homing receptor. After immunizing Biozzi's high responder mice with human RBC, we obtained a mAb, termed H90 (IgG1), which reacted with the CD44 molecule. It had a characteristic pattern of reactivity with hematologic cells, namely, it gave a strong staining with RBC, PBL, and mature medullary thymocytes, carrying high densities of CD3 molecules; likewise, the MEL14 Ab in mice (1, 3) and the Hermes-1 mAb in humans (4, 5), but, in contrast with A1G3 and A3D8 (13), it also stained numerous clusters of a few cells scattered throughout the thymic cortex. In addition, H90 blocked the adhesion of lymphocyte to HEV from lymph nodes. That mAb A3D8 and H90 recognize the same molecule was confirmed by competitive binding experiments, which gave partial blocking, co-modulation experiments, which were complete, and sequential immunoprecipitation, the single broad band in the 80- to 90-kDa region given by H90 immunoprecipitation, being precleared by previous immunoprecipitation with A3D8. None of the above results are shown except the sequential immunoprecipitation experiment (Fig. 1).

The H90 mAb and T cell activation. We investigated the effects of H90 mAb on [³H]TdR incorporation by PBL stimulated by lectins, allogeneic cells, CD3 mAb, or two pairs of CD2 mAb. No effect was seen when stimulation was mediated by lectins, CD3 mAb added in the soluble phase, or allogeneic cells, even though submitogenic amounts of the stimulating agent had been added. However, when we stimulated PBL with different pairs of CD2 mAb in the soluble phase, or a CD3 mAb previously coated on plastic culture plates, the H90 mAb markedly increased (3- to 5-fold) [³H]TdR incorporation (Fig. 2).

The H90 molecule is present both on T cells and on monocytes. Because accessory cells are required for activation via CD3 mAb or via CD2 by the two mAb pairs GT2 + T11, and D66 + T11, (10), we questioned whether T cells would be the target for the enhancing effect of H90 mAb. We therefore cultivated highly purified T lymphocytes with CD2 mAb pairs, or with CD3 mAb coated onto plastic in the presence of either H90 or other CD44 mAb (A3D8 and A1G3). As previously described, the CD2 GT2 + T11, pair did not induce any detectable [³H]TdR incorporation by purified T cells unless monocytes were added, whereas a minimal proliferation was obtained with the typical D66 + T11, pair (10). Again, the addition of H90 mAb or the CD44 mAb A3D8 markedly triggered (or increased) T cell proliferation in the presence of the CD2 or CD3 stimuli (Fig. 2). It is of note that H90 or A3D8 mAb, when used alone, was not able to trigger T cell proliferation (not shown). When we tested the effect of the F(ab) fragment of H90 mAb on T cell activation, we observed that the antibody was still mitogenic in conjunction with CD3 or CD2 mAb, suggesting that cross-linking of H90 mAb by its Fc portion was not required (Fig. 2). This was confirmed by comparing the mitogenic effect of a soluble H90 mAb with H90 mAb linked onto plastic. Under both conditions, a comparable level of proliferation was measured (not shown).

Fluorescence histograms presented in Figure 3 show that, as previously reported, purified T cells stimulated with CD3 mAb or the CD2 GT2 + T11, pair alone do not

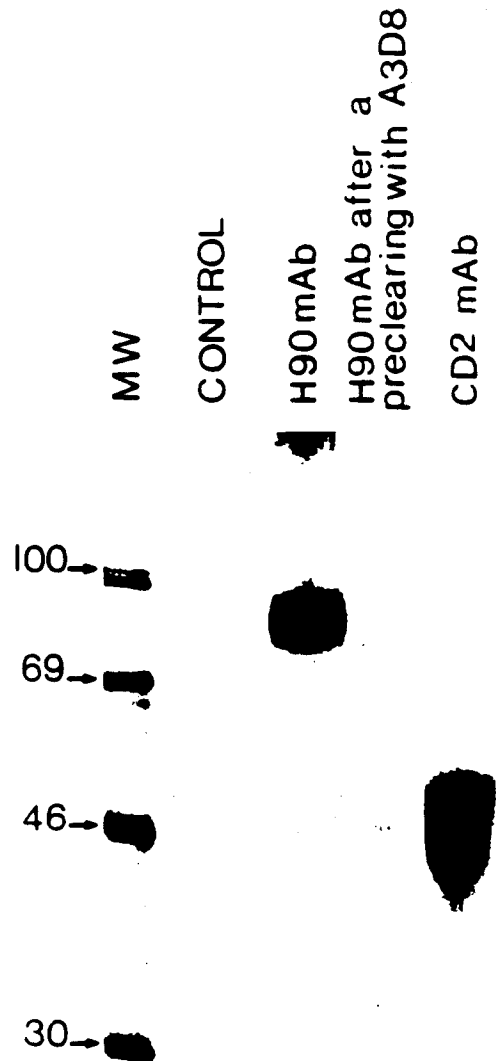


Figure 1. The m.w. determination of the Ag recognized by H90 mAb by SDS-PAGE after ¹²⁵I surface labeling of PBL. PBL were surface labeled with ¹²⁵I, lysed, and immunoprecipitated as described (9). Immunoprecipitations were performed with an irrelevant mAb (control), H90 mAb, H90 mAb after preclearing the lysate with A3D8 mAb, and CD2 "0275" mAb from our laboratory. Gels were run under non-reducing conditions. The left column shows m.w. size markers.

express the high affinity IL-2R at their surface (10). Addition of H90 mAb induced a high density of IL-2R (CD25) on these purified stimulated T cells (Fig. 2). Measurement of IL-2 synthesis in 24-h culture supernatants showed that the addition of H90 mAb triggered IL-2 production by purified T cells stimulated with plastic-linked CD3 mAb, or by the CD2 mAb pairs (not shown).

These effects of the CD44 H90 mAb on T cell activation were reminiscent of the effects described for the CD28 mAb, both in humans and mice (14), except that CD28 mAb could complement the activation signal delivered to T cells by a CD3 mAb added in the soluble phase, or by lectins (11, 15, 16). Therefore, we next examined whether, as described for CD28 mAb 9.3 (17), CD44 mAb could complement the signal delivered to purified T cells by PMA. Figure 2 shows that this was not the case, bringing additional support to the argument that different signals of activation are delivered via CD44 and CD28. Because the CD44 molecule is present at high

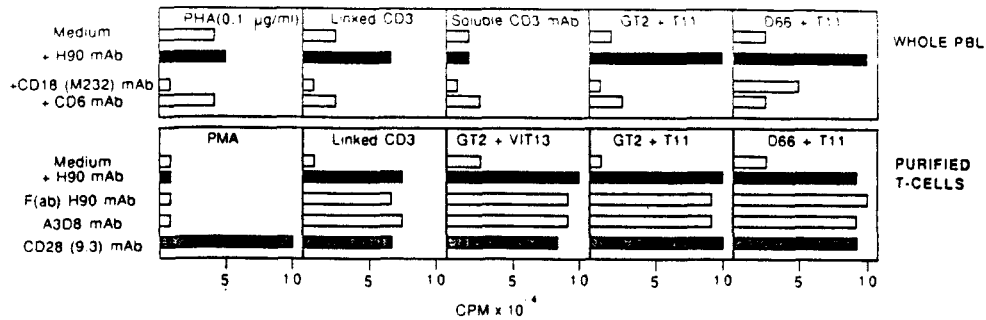


Figure 2. Effects of H90 mAb on T cell activation. Whole PBL were stimulated for 4 days with low doses of PHA, soluble CD3 (OKT3) mAb, CD3 mAb at 2 µg/ml coated onto culture plates, and two different pairs of CD2 mAb used at submitogenic doses (1:10,000 ascites). The CD2 T11 mAb was directed against the T11, epitope (9). H90 mAb was added at a plateau dilution, namely 1:200 diluted ascites. M232 mAb (9) specific for the CD1 molecule and shown to inhibit lymphocytic proliferation except when the D66 + T11 stimulus (9) was added at 10 µg/ml as a control mAb. CD6 "OKT17" mAb was also used as a control at 10 µg/ml concentration. Purified T cells prepared as described in *Materials and Methods* were stimulated with CD3 mAb coated onto plastic, various mitogenic pairs of CD2 mAb (1:400 ascites, except for VIT13, which was used at 10 µg/ml), PMA at 10⁻¹¹ M. A3D8 was used at 1:400 dilution of ascites and 9.3 at 1 µg/ml. Fab fragments of H90 mAb were prepared as described in *Materials and Methods* and added at 10 µg/ml. As proliferation controls, 10⁴ mitomycin-treated monocytes were added to 5 × 10⁴ purified T cells stimulated with CD3 mAb linked to plastic or by the CD2 GT2 + T11, mAb pair. Under these conditions, measured proliferations were, respectively, 48 × 10³ and 11 × 10³ cpm.

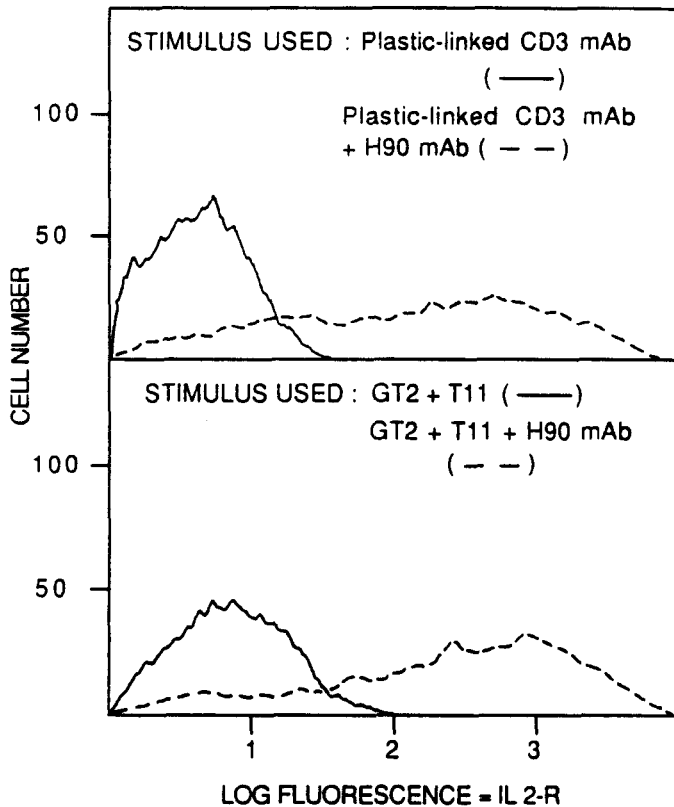


Figure 3. Effect of H90 mAb on IL-2R expression detected on CD2 or CD3 mAb-stimulated T cells. Purified T cells were stimulated for 3 days with a CD3 mAb (OKT3) previously coated on culture plates or with the CD2 GT2 + T11, pair. H90 mAb was added (---) or not (—) at a 1:400 ascites dilution at the beginning of the culture. IL-2R expression was revealed with a directly fluoresceinated CD25 (IOT14) mAb (immunotech). Log fluorescence was analyzed by using cytofluorometry (Ortho System 50H).

densities on the most mature thymocyte population, we questioned whether the CD44 mAb H90 or A3D8 could induce those cells to proliferate, as was described for CD28 (18, 19). In no instance, as shown in Figure 4, could we induce the whole thymocyte population or purified medullary (CD5⁺) thymocytes to proliferate.

These observations strongly suggest that H90 and CD28 mAb do not activate the same pathway. Note that Fab fragments of CD28 mAb were previously found to be inefficient in delivering an activation signal, in contrast

to divalent fragments (11, 20), whereas we found the Fab fragment of H90 to be efficient. Additional evidence was obtained by stimulating purified T cells with CD3 mAb linked to plastic or with the CD2 GT2 + T11, mAb pair in the presence of low and submitogenic concentrations of CD28 (9.3) mAb. Results presented in Figure 5 show that the addition of H90 mAb (also at a nonmitogenic dose) induced a very high level of [³H]TdR incorporation on T cells, indicating that the CD28 and H90 stimuli are synergistic. Note that CD28 and H90 mAb added together to a culture of purified T cells were not mitogenic (not shown). If one agrees with the conclusion that distinct activation signals are delivered via CD28 and CD44, one sees that their capacity to complement—or not—a primary signal of activation delivered to T cells by a soluble CD3 mAb, a mitogenic pair of CD2 mAb, or a cross-linked CD3 mAb fits with the known hierarchy of signaling delivered to T cells; namely, that soluble CD3 mAb delivers to T cells the "poorest" signal, whereas cross-linked CD3 mAb delivers to T cells the "richest" signal while CD2 pair delivers "intermediate" signals in terms of the complementary signals that must be delivered by IL or accessory cells to achieve plenary levels of T cell proliferation (18, 21, 22).

It is generally acknowledged that the binding of a mitogenic mAb to its Ag can mimic the specific interaction of a ligand to its receptor (for example, the CD2 and CD3 TcR activation pathways). If this is true for the H90 activation pathway, it is possible that lymphocyte binding to its ligand on HEV is sufficient to induce by itself a signal preparing T cells for an additional specific activation signal mediated by APC in the lymph node. This hypothesis is strengthened by previous observations showing that endothelial cells can act as accessory cells when T cells are stimulated by PHA or a CD3 mAb (20, 24). This effect of endothelial cells appears to be due to a direct contact with the stimulated T cells inducing an enhancement of IL-2 synthesis (23). Our results demonstrate for the first time an active role played by the CD4 molecule in the mechanism of lymphocyte proliferation

Note added in proof. Since this article was submitted for publication, the cloning and sequencing of CD4 cDNA has been reported (Stamenkovic et al., 1989, *Cel*

HOMING AND T CELL ACTIVATION

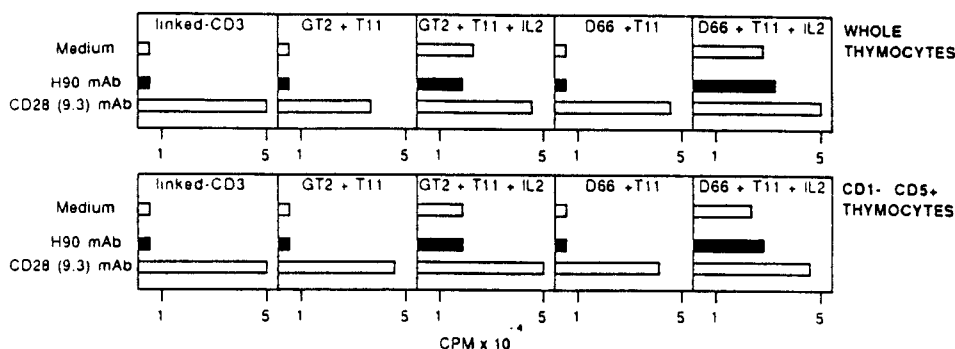
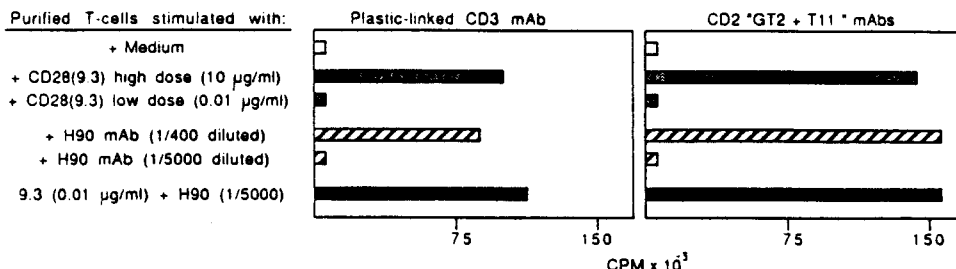


Figure 4. H90 mAb cannot induce thymocytes to proliferate. Whole thymocytes, or sorted $CD1^- CD5^+$ thymocytes (which also carry high densities of CD3) were cultivated for 3 days at 10^6 cells/ml, before measuring 3H TdR incorporation. Where indicated, 100 IL-2 units were added.

Figure 5. Synergistic effect of H90 and CD28 mAb on T cell activation. Purified T cells were stimulated with a CD3 mAb linked to plastic or with the CD2 GT2 + T11, pair in the presence of a nonmitogenic concentration of CD28 (9.3) mAb (0.01 μ g/ml). H90 mAb added at the beginning of the culture was used at a nonmitogenic dose by itself (1:5000 ascites). 3H TdR incorporation was measured at day 4 during the last 18 h of incubation.



56:1057; Goldstein et al., 1989, *Cell*, 56:1063 revealing homology to cartilage link and proteoglycan core proteins.

Acknowledgments. We thank Hieu Cong Tran and Monique Talbot for their excellent technical assistance, Drs. Frédéric Bourrel, John Hansen, and Barton Haynes for providing mAb, and Dr. Alan Shaw and the GLAXO group research for providing rIL-2.

REFERENCES

- Gallatin, W. M., I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 304:30.
- Dailey, M., W. M. Gallatin, and I. L. Weissman. 1985. The in vivo behavior of T cell clones: altered migration due to loss of the lymphocyte surface homing receptor. *J. Mol. Cell. Immunol.* 2:27.
- Jalkanen, S., R. A. Reichert, W. M. Gallatin, R. F. Bargatze, I. L. Weissman, and E. C. Butcher. 1986. Homing receptors and the control of lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* 91:39.
- Jalkanen, S. T., R. F. Bargatze, L. R. Herron, and E. C. Butcher. 1986. A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur. J. Immunol.* 16:1195.
- Jalkanen, S., R. F. Bargatze, J. de los Toyos, and E. C. Butcher. 1987. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95 kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J. Cell. Biol.* 105:983.
- Mackay, C. R., J. F. Maddox, G. L. Wiffels, I. R. Mackay, and I. D. Walker. 1988. Characterization of a 95,000 molecule on sheep leucocytes homologous to murine Pgp-1 and human CD44. *Immunology* 65:93.
- Hamann, A., D. Jablonski-Westrich, K. U. Scholz, A. Duijvestijn, E. C. Butcher, and H. G. Thiele. 1988. Regulation of lymphocyte homing. I. Alterations in homing receptor expression and organ-specific high endothelial venule binding of lymphocyte upon activation. *J. Immunol.* 140:737.
- Picker, L. J., Bargatze, J. de los Toyos, M. J. Telen, B. F. Haynes, and E. C. Butcher. 1989. Identity of CD44 In(Lu)-related p80, Pgp-1, and the Hermes class of lymphocyte homing receptors. *J. Immunol.* in press.
- Goding, J. W. 1983. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology.* Academic Press, Inc., New York.
- Huet, S., H. Wakasugi, G. Sterkers, J. Gilmour, T. Tursz, L. Boumsell, and A. Bernard. 1986. T-cell activation via CD2 [T, gp50]: the role of accessory cells in activating resting T-cells via CD2. *J. Immunol.* 137:1420.
- Martin, P. J., J. A. Ledbetter, Y. Morishita, C. H. June, P. G. Beatty, and J. A. Hansen. 1986. A 44-kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 136:3282.
- Gelin, C., L. Boumsell, J. Dausset, and A. Bernard. 1984. The heterogeneity and functional capacities of human thymocyte subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4912.
- Haynes, B. F., E. A. Harden, M. J. Telen, M. E. Hemler, J. L. Strominger, T. J. Alker, R. M. Scarse, and G. S. Eisenbarth. 1983. Differentiation of human T lymphocytes. I. Acquisition of a novel human cell surface protein (p80) during normal intrathymic T cell maturation. *J. Immunol.* 131:1195.
- Yokoyama, W. M., F. Koning, P. J. Kehn, G. M. B. Pereira, G. Stingl, J. E. Coligan, and E. M. Shevach. 1988. Characterization of a cell surface expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J. Immunol.* 141:369.
- Ledbetter, J. A., P. J. Martin, C. E. Spooner, D. Wofsy, T. T. Tsu, P. G. Beatty, and P. Gladstone. 1985. Antibodies to Tp67 and Tp44 augment and sustain proliferative responses of activated T cells. *J. Immunol.* 135:2331.
- Weiss, A., B. Manger, and J. Imboden. 1986. Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells. *J. Immunol.* 137:819.
- Hara, T., S. M. Fu, and J. A. Hansen. 1985. Human T-cell activation. II. A new activation pathway used by a major T-cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J. Exp. Med.* 161:1513.
- Yang, S. Y., S. M. Denning, S. Mizuno, B. Dupont, and B. F. Haynes. 1988. A novel activation pathway for mature thymocytes. Costimulation of CD2 (T,p50) and CD28 (T,p44) induces autocrine interleukin 2/interleukin 2 receptor-mediated cell proliferation. *J. Exp. Med.* 168:1457.
- Pierrès, A., M. Lopez, C. Cerdan, J. Nunes, D. Olive, and C. Mawas. 1988. Triggering CD28 molecules synergize with CD2 (T11.1 and T11.2)-mediated T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 18:685.
- Damle, M. K., L. V. Doyle, L. S. Grosmaire, and J. A. Ledbetter. 1988. Differential regulatory signals delivered by antibody binding to the CD28 (Tp44) molecule during the activation of human T lymphocytes. *J. Immunol.* 140:1753.
- Huet, S., L. Boumsell, B. Raynal, L. Degos, J. Dausset, and A. Bernard. 1987. Role in T-cell activation for HLA class I molecules from accessory cells: further distinction between activation signals delivered to T-cells via CD2 and CD3 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7222.
- Huet, S., L. Boumsell, J. Dausset, L. Degos, and A. Bernard. 1988. The required interaction between monocytes and peripheral blood T lymphocytes (T-PBL) upon activation via CD2 or CD3. Role of HLA class I molecules from accessory cells and the differential response of T-PBL subsets. *Eur. J. Immunol.* 18:1187.
- Geppert, T. D., and P. E. Lipsky. 1985. Antigen presentation by interferon gamma treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol.* 135:3750.
- Guinan, E. C., B. R. Smith, J. T. Doukas, R. A. Miller, and J. S. Pober. 1989. Vascular endothelial cells enhance T cell response by markedly augmenting IL-2 concentrations. *Cell. Immunol.* 118:166.

LA MOLECULE VLA-4

D] La molécule VLA-4, une intégrine aux multiples potentialités

La famille des intégrines consiste en une série d'hétérodimères ($\alpha\beta$) semblables (les sous-unités allant de 95 à 200 kDa) impliqués dans de nombreuses interactions cellules-cellules ou cellules-matrice protéique extra cellulaire. Cette famille de molécules est présente sur tous les types cellulaires et notamment les leucocytes. Ces molécules sont très conservées au cours de l'évolution puisqu'il est possible de trouver une réactivité croisée immunologique entre les sous-unités β_1 de l'homme et celle du poulet mais aussi avec celles de certains nématodes ou certains champignons (132). Les intégrines comme molécules d'adhésion ont été étudiées dans des domaines aussi différents que les plaquettes (133), la fibronectine et les peptides RGD (134-136), le développement embryonnaire (137,138) et l'adhésion des leucocytes (139,140)

•1. Les sous-familles au sein de la famille des intégrines

Les intégrines ont été divisées en 3 sous-familles caractérisées par l'utilisation différentielle d'une sous-unité β (Table). Les membres de la sous-famille β_1 (appelés aussi VLA pour Very Late Antigen) sont constitués de l'association de la sous-unité β_1 avec l'une des 6 sous-unités α différentes. Dans la sous-famille β_2 il existe 3 sous-unités α différentes et dans la famille β_3 2 sous-unités α différentes peuvent s'associer avec la sous-unité β_3 .

La découverte récente de 3 autres sous-unités β vient compliquer la classification présentée dans la table. Par exemple, α^6 s'associe parfois avec β_4 au lieu de β_1 et α^v peut s'associer soit avec β_1 soit avec β_p . De même chez la souris α^4 est associée soit avec β_1 soit avec une autre sous-unités appelés β_p (98). De toutes façons ces nouvelles sous-unités β ne définissent pas de nouvelles sous-familles car elles ne s'associent qu'avec une seule sous-unités α qui fait déjà parti d'une sous-famille.

Table 1
La famille des intégrines

Recepteur/ sous-unités	autre nom	fixation RGD	Distribution	Ligand	References
VLA-1 $\alpha^1\beta_1$	CD49a	non?	large	Collagène, Laminine	158
VLA-2 $\alpha^2\beta_1$	CD49b Ia/IIa ECMRI	non?	large	Collagène, Laminin	159
VLA-3 $\alpha^3\beta_1$	CD49c- ECMRII	oui?	large	Fibronectine, Laminine	159
VLA-4 $\alpha^4\beta_1$	CD49d- LPAM-2	non	lymphocytes, monocytes,...	VCAM-1, Fibronectine, etc...	98,155,145
VLA-4 _{alt} $\alpha^4\beta_1$	LPAM-1	non?	cellules leucemiques murines	HEV plaque de Peyer	98
VLA-5 $\alpha^5\beta_1$	CD49e Ic/IIa FNR	oui	large	Fibronectine	160
VLA-6 $\alpha^6\beta_1$	CD49f	non?	large	Laminine	161
VLA-6 _{alt} $\alpha^6\beta_1$		non?	Epithelium	?	162
LFA-1 $\alpha^L\beta_2$	CD11a	non	leucocytes	ICAM-1 ICAM-2	163,164
MAC-1 $\alpha^M\beta_2$	CD11b MAC-1 MO1 CR-3	oui?	myelocytes	C3bi,LPS, facteurX	165
p150,95 $\alpha^X\beta_2$	CD11c CR-4	non	myelocytes	C3bi?	166
IIb/IIIa $\alpha^{IIb}\beta_3$	CD41a	oui	plaquettes	Fibronectine FB,FVW,...	167
VNR $\alpha^V\beta_3$	CD51	oui	Endothelium Tumeurs	FVW,VN, FB,...	168
VNR _{alt} $\alpha^V\beta_5$		oui?	carcinomes	Fibronectine VN	169

•2. La proteine CD29/CD49d ou VLA-4

Contrairement aux autres membres de la sous-famille β_1 (les VLA) pour lesquelles seules des interactions cellules/matrice proteique

interstitielle ont été décrites, la molécule VLA-4 est impliquée à la fois lors d'interaction avec la matrice proteique extra-cellulaire mais aussi lors de contact entre cellules. D'ailleurs la molécule VLA-4, qui possède des fonctions différentes, peut se présenter sous diverses formes structurales. On peut donc penser que les variations structurales de la molécules VLA-4 sont liées à ces propriétés fonctionnelles différentes.

• 2.1. Premières caractérisations structurales

VLA-4 a été décrite pour la première fois par Hemler et al (141) comme un hétérodimère $\alpha^4\beta$. Cette molécule est le représentant de la sous-famille β_1 le plus exprimé à la surface des cellules T lymphoblastoides. Si la sous-unité β de VLA-4 est bien la même que celle partagée par les autres membres de la famille, la sous-unité α est biochimiquement différente des 5 autres sous-unités α de la sous-famille ; l'utilisation de différents anticorps monoclonaux et polyclonaux a confirmé que cette sous-unité α^4 était bien distincte des autres (142).

• 2.2. Distribution de la molécule VLA-4

Des études en cytométrie de flux montrent que la molécule VLA-4 est présente à la surface des lymphocytes B et T, des thymocytes et des monocytes. Le nombre total de sous-unités β_1 présentent à la surface des lymphocytes T et des monocytes est souvent supérieur au nombre de sous-unités α^4 ce qui montre que ces cellules expriment d'autres molécules VLA à leur surface (notamment VLA-5 et VLA-6) (143). En revanche, à la surface des lymphocytes B on détecte jusqu'à deux fois plus d' α^4 que de β_1 . Ceci suggère qu'un certain nombre de ces sous-unités α^4 à la surface des lymphocytes B ne sont pas associées à des sous-unités β_1 et qu'elle doivent donc être associées à une sous-unité β distincte comme la sous-unité β_p décrite chez la souris en association avec une sous-unité α^4 (table 1).

Sur des coupes de thymus, les thymocytes corticaux et quelques thymocytes médullaires sont reconnus par des anticorps anti-VLA-4 (CD49d) alors que sur les coupes de ganglions ce sont les zones paracorticales qui sont marquées (144). La plupart des lignées cellulaires qui se cultivent en suspension comme les cellules lymphoïdes et myéloïdes sont reconnus par les CD49d alors que les cellules adhérentes comme les

fibroblastes ou les cellules épithéliales n'expriment pas ou très peu cette molécule (145).

- **2.3. Les différentes formes biochimiques de la molécule VLA-4**

- **2.3.1 Coupure de la sous-unité α^4 en fragments de 80 et 70 kDa**

Contrairement à d'autres sous-unité α qui sont entièrement clivées dans un fragment proche du C terminal, la chaîne α^4 est clivée de manière non constante dans une partie proche du milieu de la molécule. Cette coupure engendre deux fragment de 80 et 70 kDa non reliés par des ponts disulfures. Ainsi il est possible de trouver des lignées cellulaires qui ne possèdent que la chaîne non clivée de 150 kDa comme la lignée Ramos, des lignées comme U937 qui expriment à leur surface les trois formes : $\alpha^4/150$, $\alpha^4/80$ et $\alpha^4/70$, et des lignées comme K-562 transfecté avec α^4 qui présentent uniquement les chaînes clivées $\alpha^4/80$ et $\alpha^4/70$. Mais même lorsque le clivage est total les chaînes de 80 et 70 kDa peuvent être immunoprécipitées entièrement par des anticorps CD49d (anti- α^4) ou des anticorps CD29 (anti- β_1). Les 2 chaînes restent donc associées entre-elles et mais aussi avec la chaîne β_1 (142).

Des résultats préliminaires (144,146) ont suggérés que l'activation des lymphocytes T pouvait entraîner une augmentation du clivage de la chaîne α^4 . Cependant le rôle fonctionnel de ce clivage reste à établir. Ainsi les lignées Ramos et K-562 transfecté avec α^4 qui expriment uniquement soit la forme non clivée; soit la forme clivée se fixent aussi bien sur les deux ligands actuellement connu de VLA-4 : VCAM-1 et la fibronectine (143).

- **2.3.2. La sous-unité α^4 peut s'associer à une chaîne de 30 kDa**

En plus de la forme de 150 kDa décrite précédemment, on peut rencontrer une chaîne de 180 kDa également associée à la chaîne β_1 (147). Les expériences d'immunoprécipitation, d'immunoblot et de migration en deux dimensions confirment que cette chaîne de 180 kDa est bien équivalente à la chaîne de 150 kDa et qu'une molécule de 30 kDa s'y est accolée par des ponts disulfures covalents. On ne retrouve plus cette chaîne de 180 kDa en conditions réductrice. L'identité de cette chaîne de 30 kDa et le rôle de la chaîne $\alpha^4/180$ ne sont pas encore connu.

• 2.3.3. Association de α^4 avec une autre sous-unité β

Chez la souris, une chaîne homologue à la chaîne humaine α^4 , a été caractérisée et cette chaîne peut-être associée soit à la chaîne β_1 , soit à une autre chaîne β appelée β_p (148). Chez la souris la molécule $\alpha^4\beta_p$ est présente à la surface de nombreuses lignées lymphoblastoïdes ainsi que sur les lymphocytes présents dans les ganglions mésentériques. Cette molécule qui se fixe sur les veinules post-capillaires des ganglions mésentériques apparaît donc comme un récepteur du homing spécifique des plaques de Peyer. L'équivalent de la chaîne β_p n'a pas encore été décrit chez l'homme mais il est clair qu'il est possible, tout au moins sur les lymphocytes B de rencontrer des chaînes α^4 associée à une chaîne β différente de la chaîne β_1 .

• 3. Les ligands de la molécule VLA-4

• 3.1. VLA-4 est un récepteur de la fibronectine

Dans la famille des VLA, la molécule VLA-5 a été décrite comme le récepteur cellulaire pour la fibronectine. Cette molécule se fixe à la fibronectine dans une région contenant la séquence bien connue Arg-Gly-Asp (RGD) (134,135).

Récemment, on a pu montrer que la molécule VLA-4 était capable de se fixer sur un autre domaine de la fibronectine appelé CS-1 (145). Pourtant lorsque les deux molécules VLA-4 et VLA-5 sont présentes à la surface de la cellule, la fixation à la fibronectine peut-être presque entièrement inhibée par des anticorps CD49e (anti- α^5). Ainsi la fixation de la molécule VLA-4 sur la fibronectine ne semble pas être d'une grande affinité ou alors le site CS-1 est protégé dans la molécule de fibronectine.

• 3.2. VLA-4 est un récepteur pour VCAM-1 sur les cellules endothéliales activées

La molécule VCAM-1 est une molécule d'adhésion exprimée sur les cellules endothéliales activées par des cytokines, qui permet l'interaction entre des lymphocytes et des cellules endothéliales (149). En fait la molécule VCAM-1 se fixe sur la molécule VLA-4 à la surface des lymphocytes (150). Des études parallèles ont permis de décrire une molécule nommée INCAM-

110 (151,152) présente à la surface des cellules vasculaires des sites inflammatoires. Cette molécule est exprimée sur les cellules endothéliales après activation par des cytokines. Elle permet la fixation des lymphocytes et des monocytes sur la paroi des vaisseaux au niveau des sites inflammatoires et aussi la fixation des mélanomes sur les endothéliums activés. Cette molécule est en fait la même que VCAM-1 et fixe la molécule VLA-4 à la surface des leucocytes. Ceci permet donc de conclure que la molécule VLA-4 sert à l'extravasation des cellules sur les sites inflammatoires mais aussi permet la migration des métastases de mélanomes.

•3.3. Les sites de fixation de VLA-4 sur la fibronectine et sur VCAM-1 sont différents.

En effet, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre différentes portions de la molécule α^4 et de peptides solubles de la fibronectine contenant le site CS-1 et pas le site RGD permet de montrer

i) que la fixation de VLA-4 sur VCAM-1 n'est pas inhibable par les peptides de la fibronectine

ii) que si des anticorps CD49d comme HP2/1 sont capables d'inhiber la fixation sur la fibronectine et sur VCAM-1, il existe des anticorps CD49d comme HP1/3 qui sont spécifiques de la zone d'interaction avec VCAM-1 et qui n'inhibent pas la fixation de VLA-4 sur la fibronectine (153).

•4. Les rôles fonctionnels potentiels attribués à la molécule VLA-4

Comme le montre la table 2 la molécule VLA-4 est impliquée dans des fonctions qui ne font pas intervenir la fixation sur la molécule VCAM-1 ou sur la fibronectine.

Table 2

Résumé des rôles potentiels de la molécule VLA-4

Fonction	Ligand	References
Fixation à la fibronectine	Site CS-1	145,150
Fixation aux cellules endothéliales	VCAM-1	150,153
Aggregation hétérotypique entre cellule T cytotoxiques et cellule B cibles	inconnu	154,155
Aggregation homotypique entre lymphocytes T-T ou B-B	inconnu	156
Interaction entre lymphocytes T helper et T supresseurs	inconnu	48

• **4.1. Action sur les cellules cytotoxiques**

L'anticorps monoclonal L25, dirigé contre la chaîne α^4 , est capable de bloquer partiellement l'action cytotoxique T dirigée contre des lymphomes B (154,155). L'anticorps agit en se fixant sur l'effecteur T et n'entraîne aucune inhibition de cytotoxicité lorsqu'il est fixé sur la cible B. La molécule VLA-4 agit probablement dans ce système en facilitant la cytotoxicité par une augmentation de la fixation entre la cellule cytotoxique et sa cible. Pourtant, les cellules cibles B n'expriment pas la molécule VCAM-1 à leur surface ce qui suggère que la molécule VLA-4 à la surface des cellules cytotoxiques reconnaît soit la fibronectine soit un autre ligand encore inconnu. Or l'anticorps B-5G10 (CD49d) qui n'inhibe la fixation de VLA-4 ni sur la fibronectine, ni sur VCAM-1, est capable d'inhiber partiellement l'action cytotoxique T dirigées contre des lymphomes B (147). Ce résultat est en faveur d'un troisième ligand encore inconnu.

• **4.2. Aggregation homotypique T-T ou B-B.**

L'incubation de cellules T avec des anticorps CD49d (notamment L25) entraîne une aggrégation importante et rapide des cellules (156). Cette aggrégation peut être inhibée par d'autres anticorps CD49d et notamment l'anticorps B-5G10 ce qui suggère que la molécule VLA-4 est à la fois le récepteur et l'inducteur de cette réaction d'aggrégation. Si VLA-4 est capable d'induire une aggrégation cellulaire c'est que cette molécule est capable de transduire des signaux d'activation. D'autre part si l'anticorps B-5G10 est capable d'inhiber cette réaction c'est que là encore la molécule VLA-4 utilise un ligand différent de la fibronectine ou de la molécule VCAM-1.

•5. Action suppressive et augmentation d'AMPc dans les lymphocytes CD4⁺

Résumé de l'article 3

Nous avons utilisé différents anticorps dirigé contre la molécule VLA-4 afin de déterminer quel pouvait-être son rôle dans l'activation des lymphocytes T. L'anticorps K20, un anti- β_1 et l'anticorps O403, un anti- α^4 ont été développés dans le laboratoire d'A Bernard. Les autres anti- α^4 , HP2.1, TS2/16, HIT4, L25 et 5D5 et l'anti- β_1 4B4 nous ont été fournis par différents laboratoires.

L'anticorps K20 est capable d'inhiber complètement la prolifération des lymphocytes T activés par des anticorps CD3. Cette inhibition est corrélée à une augmentation importante de l'AMPc, un second messager impliqué dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes. En effet, la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, inhibe elle aussi la prolifération des lymphocytes T. Il est à noter que l'anticorps K20 seul ne permet pas l'augmentation de l'AMPc et qu'il faut l'action commune de l'anticorps K20 et d'anticorps CD3 ou d'une paire d'anticorps CD2 pour obtenir l'augmentation d'AMPc intracellulaire. L'anticorps K20 n'a donc d'effet que sur des cellules en début d'activation. D'autre part, cette inhibition de prolifération par l'anticorps K20 est corrélée à une diminution de synthèse d'IL2 et d'expression du récepteur à l'IL2.

Contrairement à l'anticorps K20, les autres anti-VLA-4 n'ont soit aucun effet sur la prolifération des cellules mononuclées du sang périphérique comme 4B4, 5D5, L25, soit augmentent celle-ci comme O403, HP2.1, TS2/16 et HIT4. Or, les anticorps comme O403 n'ont aucun effet sur la prolifération des cellules purifiées T CD4⁺ ou des cellules T CD11b⁻

(CD11b est un marqueur de cellules suppressives) donc sur la prolifération de cellules en l'absence de cellules suppressives CD8⁺, CD11b⁺.

Il est possible d'inhiber la prolifération de cellules CD4⁺ stimulées par des anticorps CD3, en ajoutant à la culture des cellules T suppressives de phénotype CD8⁺ traitées à la mitomycine. Dans ce système, il est possible de montrer que les anticorps comme O403 ou HP2.1 sont capables d'inhiber l'action des cellules T suppressives et donc de restaurer la prolifération des lymphocytes T CD4⁺.

Il semble donc que la molécule VLA-4 sert à contrôler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ en transmettant le signal supprimeur apporté par les cellules CD8⁺. Cette molécule serait donc le récepteur (ou le ligand) d'une molécule présente à la surface des lymphocytes T supprimeurs CD8⁺. Cette hypothèse permet d'expliquer également l'observation de Sasazuki et coll. (157) sur le blocage induit par l'anticorps 4B4 de la suppression par des cellules CD8⁺ de la synthèse spécifique d'IgE induite par des cellules CD4⁺.

D'autre part, en mimant l'action des cellules suppressives, cet anticorps peut-être utilisé pour atténuer par exemple les réactions du greffon contre l'hôte, ce qui a déjà été réalisé thérapeutiquement avec succès.

synthesized locally at inflammatory sites by mast cells, would attract, maintain growth and stimulate granulocytes, macrophages and eosinophils, thus ensuring the retention and activation of these cells at the region of inflammation. Secreted IL-3 would support continuous proliferation of mast cells. It has recently been shown that fetal liver-derived non-activated mast cells express mRNA for interleukin-4 (BSF-1), a B cell growth factor²⁸, known to promote the isotype switching of B cells to IgE (ref. 29). Taken together with our data on IgE-dependent production of IL-3, these results imply that mast cells actively modulate, both indirectly and directly, their own growth and functional activity.

In summary, as a result of secretion of growth factors, mast cells may play a far more important part in allergic and immune responses than has been assumed so far. Secretion of lymphokines accompanying FcεR-mediated activation of mast cells would enable the local defence system to become self-regulated. This may have major implications in diseases such as allergic asthma. Whether mature human blood basophils and/or tissue mast cells also have the capacity to generate these lymphokines in response to allergen stimulation is currently under investigation. □

Received 24 February; accepted 6 April 1989.

1. Metzger, H. *Adv. Immun.* **43**, 277-312 (1988).
2. Metzger, H. & Kinet, J.-P. *FASEB J.* **2**, 3-11 (1988).
3. Dexter, T. M. & Spooner, E. A. *Rev. Cell Biol.* **3**, 423-441 (1987).

4. Dexter, T. M. *J. Cell Sci.* **88**, 1-6 (1987).
5. Blaser, K. & Heusser, Ch. H. *Int. Rev. Immun.* **2**, 93-115 (1987).
6. Thorens, B., Mermod, J.-J. & Vassalli, P. *Cell* **48**, 671-679 (1987).
7. Schuler, G. D. & Cole, M. D. *Cell* **55**, 1115-1122 (1988).
8. Shaw, G. & Kamen, R. *Cell* **48**, 659-667 (1988).
9. Caput, D. et al. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1670-1674 (1986).
10. Ball, P. E., Conroy, M. C., Heusser, C. H., Davis, J. M. & Conscience, J.-F. *Differentiation* **24**, 74-78 (1983).
11. Dexter, T. M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E. & Metcalf, D. *J. exp. Med.* **152**, 1036-1047 (1980).
12. Harnett, M. M. & Klaus, G. G. B. *Immun. Today* **9**, 315-320 (1988).
13. Berridge, M. J. A. *Rev. Biochem.* **56**, 159-193 (1987).
14. Cookcroft, S. & Gomperts, B. D. *Nature* **314**, 534-537 (1985).
15. Beaven, M. A. et al. *J. Biol. Chem.* **259**, 7129-7136 (1984).
16. Cunha-Melo, J. R., Dean, N. M., Moyer, J. D., Maeyama, K. & Beaven, M. A. *J. Biol. Chem.* **262**, 11455-11463 (1987).
17. White, J. R., Ishizaka, T., Ishizaka, K. & Sha'afi, R. I. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 3978-3982 (1984).
18. Barlow, D. P., Bucan, M., Lehrach, H., Hogan, L. M. & Gough, N. M. *EMBO J.* **6**, 617-623 (1987).
19. Gough, N. M. & Burgess, A. W. in *Oncogenes, Genes and Growth Factors* (ed. Guroff, G.) 165-192 (Wiley, New York, 1987).
20. Metcalf, D. *Science* **229**, 16-22 (1985).
21. Lopez, A. F. et al. *J. Immun.* **131**, 2983-2988 (1983).
22. Gasson, J. C. et al. *Science* **226**, 1339-1342 (1984).
23. Grabstein, K. H. et al. *Science* **232**, 506-508 (1986).
24. Weisbart, R. H., Kacena, A., Schuh, A. & Golde, D. W. *Nature* **332**, 647-648 (1988).
25. Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M. & Koeffler, H. P. *Nature* **323**, 79-82 (1986).
26. Ymer, S. et al. *Nature* **317**, 255-258 (1985).
27. Nair, A. P. K. et al. *Mol. Cell Biol.* **9**, 1183-1190 (1989).
28. Brown, M. A. et al. *Cell* **50**, 809-818 (1987).
29. Snapper, C. M. & Paul, W. E. *Science* **236**, 944-947 (1987).
30. Razin, E., Cordon-Cardo, C. & Good, R. A. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2559-2561 (1981).
31. Gough, N. M., Metcalf, D., Gough, J., Grail, D. & Dunn, A. R. *EMBO J.* **4**, 645-653 (1985).
32. Maroni, G., Kagey-Sabotka, A. & Lichtenstein, L. M. *Int. Archs Appl. Immun.* **68**, 339-343 (1981).

ACKNOWLEDGEMENTS. We thank I. Schweizer for technical assistance, Dr N. M. Gough for plasmid probes, Dr V. Kinder for antibodies, Dr N. Subramanian for histamine determinations, and Drs M. A. Bray, N. Iscove and P. Erb for critical reading of the manuscript.

Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by the CD29 molecule of CD4⁺ lymphocytes

Hervé Groux, Stéphane Huet, Hélène Valentin, Danièle Pham & Alain Bernard

Laboratoire d'Immunologie des Tumeurs de L'Enfant, Institut Gustave-Roussy, 94805 Villejuif Cedex, France

INTEGRINS are a superfamily of related molecules whose function, where known, is to mediate adhesion. The so-called very-late-activation antigen (VLA) family includes at least five distinct heterodimers, each composed of a unique α -subunit non-covalently associated with a common β -subunit. Several members of the family have been shown to bind extracellular matrix proteins, but the function of VLA-4 is so far unknown¹⁻⁴. VLA-4 is the only member of the family detected on thymocytes and resting T cells. We show here that an antibody which recognizes the β -subunit of VLA-4 (CD29) on T cells can inhibit CD4⁺ cell proliferation triggered by CD2 or CD3, and that binding of this antibody to activated T cells leads to an increase in cyclic AMP levels which is comparable to that elicited by forskolin. These negative signalling effects are unique to this antibody: other CD29 antibodies do not affect the growth of activated CD4 cells but enhance the proliferation of whole T cell populations and abrogate the suppressive effects of mitomycin-treated CD8 cells on CD4-cell growth. Taken together, our results indicate that VLA-4 functions in cell-cell interactions and that it is the target for the suppressive effects of CD8 cells on CD4 cells.

We used eight anti-VLA monoclonal antibodies, all of which have a similar pattern of tissue distribution and react with thymocytes. Some are already well defined: K20 and 4B4—both of which were initially used to define CD29 (ref. 5)—and TS2/16 all recognize the common β -subunit⁶, whereas HP2/1 recognizes the α^4 -subunit⁶. We also used another antibody, O403, which immunoprecipitates the same molecular complex as HP2/1 (Fig. 1)³ and the same molecule as K20, as demonstrated by sequential

TABLE 1 Effect of CD29 antibody on cAMP in T cells and CD4⁺ cells*

Activators	Effectors	cAMP at 10 min (fmol per 3×10^5 cells)	cAMP at 30 min (fmol per 3×10^5 cells)
T cells			
None	None	350 ± 130	380 ± 160
<i>Idem</i>	K20 (50 μ g ml ⁻¹)	345 ± 105	335 ± 140
<i>Idem</i>	O403 (50 μ g ml ⁻¹)	330 ± 120	365 ± 130
CD3 antibody crosslinked +rIL-1 (100 U ml⁻¹)			
None	None	620 ± 140	410 ± 120
<i>Idem</i>	K20 (50 μ g ml ⁻¹)	945 ± 85	1,510 ± 230
<i>Idem</i>	O403 (50 μ g ml ⁻¹)	560 ± 220	410 ± 80
GT2 + T11₁ +rIL-1 (50 U ml⁻¹)			
None	None	520 ± 130	410 ± 80
<i>Idem</i>	K20 (50 μ g ml ⁻¹)	1,105 ± 130	1,420 ± 160
<i>Idem</i>	O403 (50 μ g ml ⁻¹)	495 ± 140	350 ± 130
None	Forskoline (5 × 10 ⁻⁴ M)	1,120 ± 130	1,630 ± 150
CD4⁺ cells			
None	None	325 ± 140	410 ± 220
<i>Idem</i>	K20 (50 μ g ml ⁻¹)	330 ± 170	395 ± 145
<i>Idem</i>	O403 (50 μ g ml ⁻¹)	380 ± 160	420 ± 150
CD3 antibody crosslinked +rIL-1 (100 U ml⁻¹)			
None	None	540 ± 120	430 ± 150
<i>Idem</i>	K20 (50 μ g ml ⁻¹)	890 ± 130	1,440 ± 230
<i>Idem</i>	O403 (50 μ g ml ⁻¹)	490 ± 150	380 ± 140
None	Forskoline (5 × 10 ⁻⁴ M)	980 ± 180	1,560 ± 210

* cAMP was assayed by radioimmunoassay. Briefly, cells were washed three times with RPMI 1640 and resuspended in the same buffer at a concentration of 1.5×10^6 cells per ml in the presence of different effectors. After incubation at 37 °C, the reaction was stopped by heating at 80 °C for 3 min. Samples were then treated with 1 ml ethanol, centrifuged and the supernatants collected. After evaporation, the residues were dissolved in PBS and cAMP was assayed using a cAMP-[¹²⁵I] assay system (dual range) (Amersham). Results are expressed in femtomoles ± s.d. (n = 4).

immunoprecipitation from lysates of [¹²⁵I]-surface-labelled thymocytes (Fig. 1). Thus all our antibodies react with the VLA-4 molecule on resting T cells. From competitive binding experiments, we have shown that K20 reacts with a distinct epitope compared with the other monoclonal antibodies used here (data not shown).

K20, or its F(ab')₂ fragment, inhibited T-cell proliferation induced by a monoclonal antibody against CD3, by two different pairs of CD2 antibody, or by TPA(12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) plus ionomycin (Fig. 2a and c). Thus it counteracts the effects of many stimulating agents, including those active at the post-receptor level. Moreover, the inhibitory effect of K20 is directly exerted on T cells, as it was observed when highly purified peripheral blood T lymphocytes were stimulated in the presence of recombinant interleukin 1 (rIL-1). K20 inhibited synthesis of interleukin 2 (IL-2) (Fig. 3); it also blocked the appearance of IL-2 receptors (IL2-R), but only when T cells were stimulated by CD3 and not by CD2 (Fig. 3). This is in agreement with our data on [³H]thymidine incorporation in the presence of K20: strong inhibition when T cells are activated by CD3 and partial inhibition on activation by CD2 (Fig. 2c). It is also consistent with our previous observations regarding T-cell activation by CD2 as compared with CD3, namely that distinct primary signals of activation are delivered to the T cell by these molecules^{7,8}. When we tested K20 on sorted CD4⁺ cells, we found that it still blocked their proliferation (Fig. 2d).

The inhibitory signal transmitted by the CD29 molecule is most probably mediated by cAMP, because we found that K20 induces a rapid, high and durable increase of cytosolic cAMP,

maintained for up to 60 min (Table 1). The level of cAMP attained is comparable to the level measured in the positive control in which cells were incubated with forskolin, a direct and potent activator of adenylate cyclase. For this rise to occur, T or CD4⁺ cells need, in addition to K20, to be activated either by a CD3 antibody or by a pair of CD2 antibodies. Activation of adenylate cyclase, either directly with forskolin⁹ or with prostaglandin PGE₂ (ref. 6), enhances cAMP turnover, leading to diminution of IL-2 synthesis, inhibition of lectin-stimulated polyphosphoinositide turnover¹⁰ and inhibition of T-cell proliferation. Indeed K20, like PGE₂, inhibits IL-2 synthesis in Jurkat cells by increasing the cytosolic cAMP level (data not shown). The increase of cytosolic cAMP induces suppressive effects on the immune response (for review, see ref. 11).

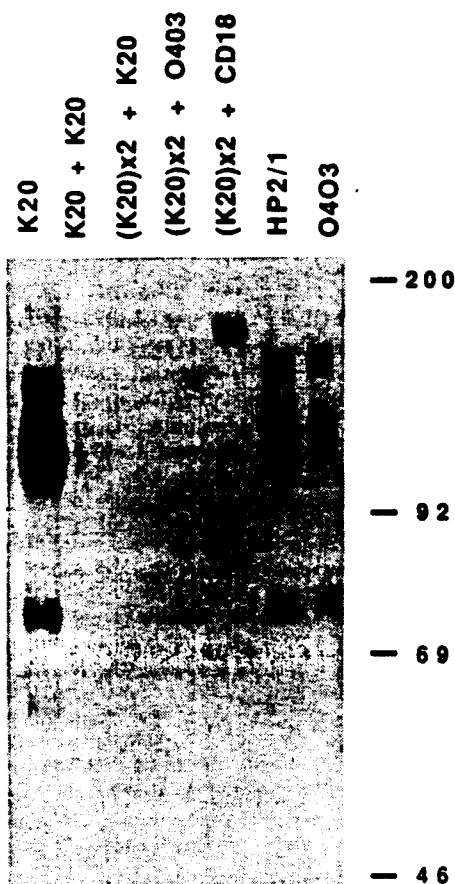


FIG. 1 Western blot to characterize the molecule recognized by O403 on T cells. K20 (γ 2a) and O403 (γ 1) were isolated as described¹⁶; HP2/1 was donated by F. Sanchez-Madrid⁵, and reacted with the VLA-4 heavy chain (ref. 1). Monoclonal antibody K20 was ascribed to CD29 by the agreement in ref. 5. The results of immunoprecipitation and sequential immunoprecipitation on lysates from [¹²⁵I]-surface-labelled thymocytes⁴ are shown using K20 (lane 1), HP2/1 (lane 6), O403 (lane 7), and with K20 after one or two cycles of pre-clearing with K20 (lanes 2 and 3 respectively), with O403 after two cycles of pre-clearing with K20 (lane 4), or with CD18 M232 (ref. 9) after two cycles of pre-clearing with K20 for comparison (lane 5). Molecular weight calibration (K) is shown on the right.

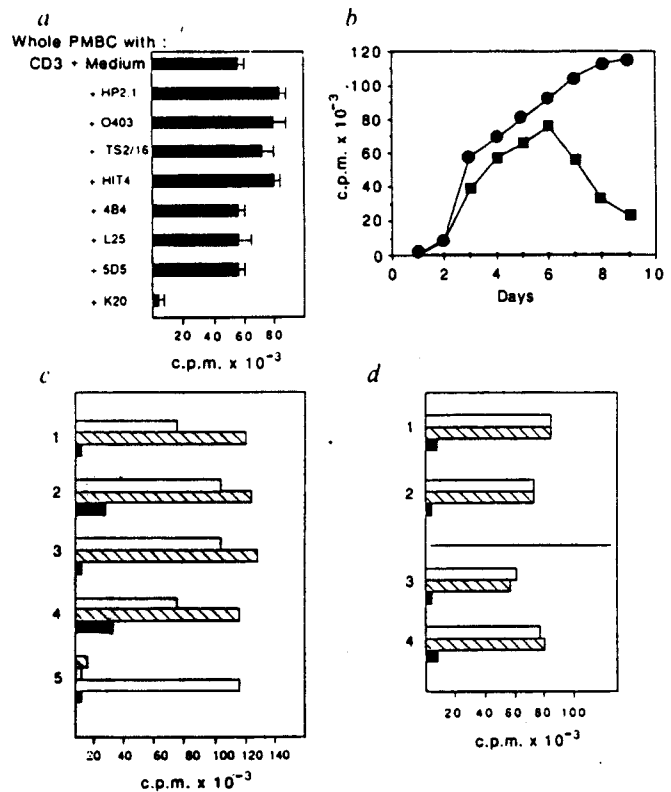
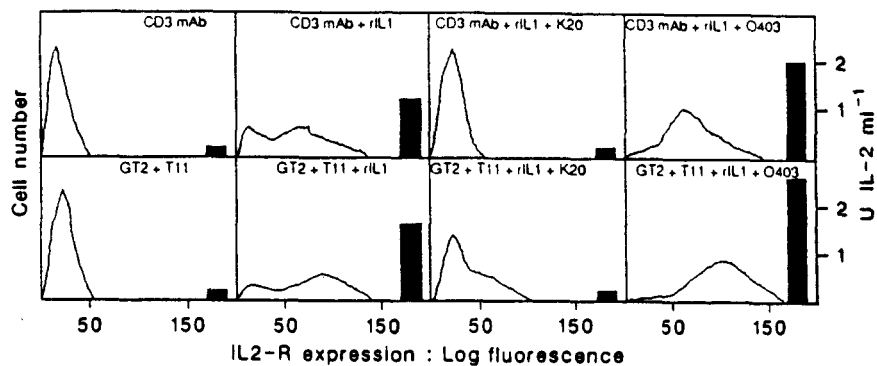


FIG. 2 Effect of a battery of CD29 antibodies on T-cell activation. Eight CD29 antibodies were tested. *a*, [³H]thymidine incorporation, measured at day 3, by whole peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with a soluble CD3 (X35.7) in the presence of 10 μ g ml⁻¹ of CD29 antibody or in medium alone. *b*, Kinetics of [³H]thymidine incorporation by highly purified T cells⁷ stimulated with CD3 antibody coated on culture plates²⁰ plus rIL-1 (100 U ml⁻¹), in the presence of CD29 O403 (\bullet) (5 μ g ml⁻¹), CD29 K20 (\blacktriangle) (5 μ g ml⁻¹; all points fall on abscissa), or an irrelevant antibody (CD1 D47) (\square). *c*, Effect of O403 (5 μ g ml⁻¹) (cross-hatched; 1-4) and K20 used as F(ab')₂ fragments (filled bars; 1-5)²¹ (10 μ g ml⁻¹) on whole PBMC (1 and 2) or on highly purified T cells (3-5). Whole PBMC were stimulated with either soluble CD3(1) or two typical mitogenic pairs of CD2 antibodies (2) (ref. 7). Purified T cells were stimulated with either CD3 coated on culture plates²⁰ plus rIL-1 (Giaco; 100 U ml⁻¹) (3) or with two particular mitogenic pairs of CD2 (ref. 7) plus rIL-1 (50 U ml⁻¹) (4) or with TPA (10⁻¹¹ M) plus ionomycin (60 μ g ml⁻¹) (5) at a concentration such that no proliferation could occur with these agents alone (thick cross-hatched and dotted bars respectively). [³H]thymidine incorporation was measured on day 3, when T cells were stimulated by CD3, and on day 4 when T cells were stimulated by CD2. *d*, Effect of CD29 antibodies on proliferation of sorted T-cell subsets (top panel, CD4⁺ cells; lower panel, Leu 15⁻ cells). CD4⁺ cells were selected for negatively using CD8 X8 antibody plus rabbit complement²². Leu 15⁻ cells were isolated by cell-sorter analysis (Leu 15 purchased from Becton Dickinson). The different subsets were stimulated as T cells and CD29 antibodies were used and designated as in *c*.

FIG. 3 Effect of CD29 on IL2-R expression and IL-2 synthesis detected in T cells stimulated via CD3 or CD2. Purified T cells were stimulated for 3 days with the CD3 antibody X35.7, previously coated on culture plates or with the CD2 GT2 + T11, both in the presence of rIL-1 (100 U ml^{-1}). Monoclonal antibodies were added at $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ at the start of culture. IL2-R expression was revealed with a directly fluorocinated CD25 (IOT14) antibody (Immunotech, Marseilles). Log fluorescence was analysed by cytofluorometry (Ortho System 50H). Supernatants of stimulated T cells were tested after 24 h for IL-2 activity by measuring the proliferation of the IL-2-dependent CTL-L2 cell line²³.



At this stage, we assumed that K20 exerts an agonistic effect on CD29, which might act as a receptor for a suppressive effect on T-cell proliferation. We therefore searched for other anti-VLA antibodies that would exert effects opposite to those of K20. We found that 4 out of the 7 other antibodies tested enhanced [³H]thymidine incorporation by whole peripheral blood mononuclear cells or by highly purified T cells that had been stimulated via either CD3 or CD2 (Fig. 2a and c). The 'enhancing' monoclonal antibodies, which include HP2/1 reacting with the α -chain, act by increasing the amount of IL-2 released and the number of cells carrying the IL2-R (Fig. 3).

We also observed a profound change in the kinetics of T-cell proliferation stimulated by mitogenic CD3 antibodies plus rIL-1: an enhancing mAb, O403, induces a continuous increase in the level of [³H]thymidine incorporation over 9 days of culture (Fig. 2b). It should be noted that this dramatic change in the kinetics of [³H]thymidine incorporation could only be seen under these particular conditions. The enhancing anti-VLA antibodies could exert their effect only when the whole T-cell population is cultivated, and not just on separated CD4⁺ or Leu 15⁻ subsets (Leu 15 is a T-suppressor cell marker¹²), that is, in the absence of suppressor T cells (Fig. 2d). In addition, the enhancing antibody abrogates the suppression of the proliferation of CD4⁺ cells exerted by mitomycin-treated CD8⁺ cells (Table 2). This action must be directly targeted at CD4⁺ cells as the inhibition is still effective with a large excess of mitomycin-treated CD8⁺ cells.

Thus it seems that the CD29 molecule acts as a receptor

controlling CD4⁺-cell proliferation. K20 would mimic the fixation of the 'physiological' ligand of CD29 that issues from CD8⁺ cells, which could be either a surface molecule or a soluble ligand, whereas the enhancing antibodies block its function. This conclusion explains observations on the blocking effect of the CD29 antibody 4B4 on the suppression induced by CD8⁺ cells on the specific immunoglobulin E response induced by CD4⁺ cells¹³, as well as our data reported here.

Within the CD4⁺ T-cell population, 4B4, together with the CD45R antibody 2H4, has enabled two reciprocal subsets to be distinguished: the CD4⁺ CD29⁺ helper-inducer subset; and the CD4⁺ CD45R subset acting as suppressor-inducer^{14,15}. In view of recent data showing that the CD29⁺ subset (CD29^{high}) and the reciprocal CD45R⁺ subset (CD45R^{high}) represent memory and naive cells^{16,17} respectively, one can speculate on the role of the CD29 molecule in the regulation of the immune response. As naive CD4⁺ cells tend to inhibit, and memory CD4⁺ cells vigorously induce, antibody production, the increase in the density of CD29 molecules could act to create a condition that renders them susceptible to control by CD8⁺ cells. This fits with our observation that CD4⁺ cells must be activated to induce the inhibitory rise of cAMP. Because one of the primary functions of the CD29 molecule on CD4⁺ T cells would be to mediate an increase in levels of cAMP, we can see why functionally specialized leucocyte subsets other than CD4⁺ cells would carry this molecule. K20, or eventually the natural ligand that it mimics, might be a candidate to artificially induce immunosuppression. □

TABLE 2 Effect of CD29 antibody on [³H]thymidine incorporation by untreated CD4⁺ cells co-cultured with mitomycin-treated cells. TS2/16 is also a CD29 antibody

Cells co-cultured with CD4 ⁺ cells (4 × 10 ⁴)	CD29 antibody			
	Medium	O403	HP2/1	TS2/16
Mitomycin-treated CD8 ⁺ cells				
000	52,217	59,875	52,164	58,671
2 × 10 ⁴	50,817	48,916	58,714	42,157
4 × 10 ⁴	40,916	49,875	51,795	39,854
8 × 10 ⁴	32,824	51,897	56,472	54,153
12 × 10 ⁴	12,715	48,796	49,257	50,479
16 × 10 ⁴	8,712	45,795	42,158	45,879
Mitomycin-treated CD4 ⁺ cells				
16 × 10 ⁴	51,876	48,876	53,289	57,894

The sorted CD4⁺ cells were stimulated with a coated CD3 antibody plus rIL-1 (50 U ml^{-1}). Increasing amounts of mitomycin-treated CD8⁺ or CD4⁺ cells were added at the start of the culture, either alone or in the presence of different CD29 antibodies ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$). The results are given in c.p.m. and represent the means of triplicates of one experiment representative of 3. We excluded the possibility that suppression might arise from IL-2 consumption, because mitomycin-treated CD4⁺ cells did not show an inhibitory effect, and mitomycin-treated CD8⁺ did not suppress the IL-2 response of the cytotoxic T lymphocyte-L2 line (not shown).

Received 23 January; accepted 3 April 1989.

- Hemier, M. E. *Immun. Today* 9, 109-113 (1988).
- Hemier, M. E. *et al. J. Biol. Chem.* 262, 11478-11485 (1987).
- Sanchez-Madrid, F. *et al. Eur. J. Immun.* 18, 1343-1349 (1988).
- Amiot, M. *et al. Scand. J. Immun.* 3, 109-117 (1986).
- McMichael, A. J. & Gotch, F. M. in *Leucocyte Typing III - White Cell Differentiation Antigens* (ed. McMichael A. J.) 52 (Oxford University Press, 1987).
- Rappaport, R. S. & Dodge, G. R. *J. exp. Med.* 158, 943-938 (1982).
- Huet, S. *et al. J. Immun.* 137, 1420-1428 (1986).
- Huet, S. *et al. Proc. natn. Acad. Sci. (U.S.A.)* 84, 7222-7226 (1987).
- Mary, D., Aussel, C., Ferrus, B. & Fehmann, M. *J. Immun.* 138, 1179-1184 (1987).
- Lerner, A., Jacobson, B. & Miller, R. A. *J. Immun.* 140, 936-940 (1988).
- Kammer, G. M. *Immun. Today* 9, 222-229 (1988).
- Landay, A., Gartland, G. L. & Clement, L. T. *J. Immun.* 131, 2757-2761 (1983).
- Sasazuki, T. *et al. in Leucocyte Typing III - White Cell Differentiation Antigens* (ed. McMichael A. J.) 223-225 (Oxford University Press, 1987).
- Morimoto, C. *et al. J. Immun.* 134, 3762-3769 (1985).
- Morimoto, C., Letvin, N. L., DiStasio, J. A., Aldrich, W. R. & Schlossman, S. F. *J. Immun.* 134, 1508-1515 (1985).
- Sanders, M. E. *et al. J. Immun.* 140, 1401-1407 (1988).
- Sanders, M. E., Makgoba, M. W. & Shaw, S. *Immun. Today* 9, 195-198 (1988).
- Bounsell, L. & Bernard, A. *J. Immunol. Meth.* 38, 225-229 (1980).
- Hemier, M. W., Huang, C. & Schwarz, L. *J. Biol. Chem.* 262, 3300-3309 (1987).
- Walker, C., Bettens, F. & Pichler, W. *J. Eur. J. Immun.* 17, 1611-1618 (1987).
- Parham, P. *J. Immun.* 131, 2895-2902 (1983).
- Emsley, M. N., Fox, E. J. & Rich, R. R. *J. Immun.* 137, 2468-2477 (1986).
- Gillis, S., Ferr, M. M., Ou, W. & Smith, K. A. *J. Immun.* 120, 2027-2032 (1978).

ACKNOWLEDGEMENTS. We thank Drs Max Fehmann and L. Bounsell for discussion, Drs Bounsell, Hemier, Sanchez-Madrid and Schlossman for monoclonal antibodies, and the Glaxo Institute for Molecular Biology for rIL-1. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Fondation de France and Electricité de France.

LES SUPERANTIGENES

E] L'activation des lymphocytes T par les "superantigènes"

Il existe depuis peu en immunologie un nouvel outil permettant d'étudier l'activation des lymphocytes T via le TCR, les "superantigènes". Ces protéines issues de bactéries ou de virus, sont capables en se fixant d'une part sur les molécules CMH-II et d'autre part sur certaines chaînes V β du TCR d'activer un pourcentage assez important (10 à 40%) des cellules T, d'une manière mimant presque parfaitement l'activation antigénique qui elle n'implique au maximum qu'une cellule sur 10 000. . La description récente de l'implication d'un "superantigène" viral dans la pathogénèse d'un syndrome d'immunodéficience chez la souris, confère à ces protéines un intérêt tout particulier dans notre étude.

•1. Des toxines bactériennes mitogènes.

Depuis quelques années, les immunologistes savent que certaines toxines issues de bactéries sont capables d'activer un grand nombre de lymphocytes T. Ces toxines sont des protéines produites par différents types de bactéries comme les staphylocoques, les streptocoques et les mycoplasmes.

Toxine	bactéries	maladie	ref.
Enterotoxines staphylococciques (ES) A, B, C1, C2, C3, D et E	<i>S. aureus</i>	empoisonnement alimentaire, choc	171
Toxine du syndrome de choc toxinique (TSST1)	<i>S. aureus</i>	choc toxinique	172
Toxines exfoliante A et B	<i>S. aureus</i>	syndrome de la peau brulée	173
Exotoxine pyrogènes A, B et C	<i>S. pyogenes</i>	Fièvre, choc	174
<i>M. arthritidis</i> mitogène	<i>M. arthritidis</i>	choc	175

Ces toxines engendrent chez l'homme et les animaux diverses maladies comme les chocs toxiques (TSST1) ou des infections alimentaires (ESA, ESB etc...). Ces toxines possèdent des structures communes à toutes les toxines étudiées. De plus, la séquence la mieux conservée parmi ces toxines située au centre de la chaîne polypeptidique, présente une homologie avec la partie COOH-terminale de la chaîne invariante de l'homme et de la souris. Cette chaîne invariante est une molécule fixée sur les molécules de CMH de classe II au cours de leur maturation au sein de l'ergastoplasme. Le rôle de cette chaîne invariante serait d'empêcher stériquement la fixation de peptides endogènes sur les molécules de classe II. La séparation entre la chaîne invariante et la molécule de classe II à la surface de la cellule permettrait la fixation de peptide immunogéniques exogènes (176-178). La similitude entre la chaîne invariante et les toxines mitogènes n'est certainement pas une coïncidence car ces molécules se fixent elles aussi sur les molécules de classe II du CMH.

•2. Ces toxines se fixent sur les molécules de classe II du CMH.

Toutes ces toxines se fixent avec une affinité plus ou moins grande sur les molécules de classe II du CMH. (179-181). On ne connaît pas la structure du complexe formé par l'association toxine-molécule de classe II mais il semble que la toxine ne se fixe pas sur la molécule de classe II dans la gouttière formée par un plateau en feuillet β plissé supportant deux hélices α servant de réceptacle aux peptides antigéniques. En effet, Dellabone et coll.

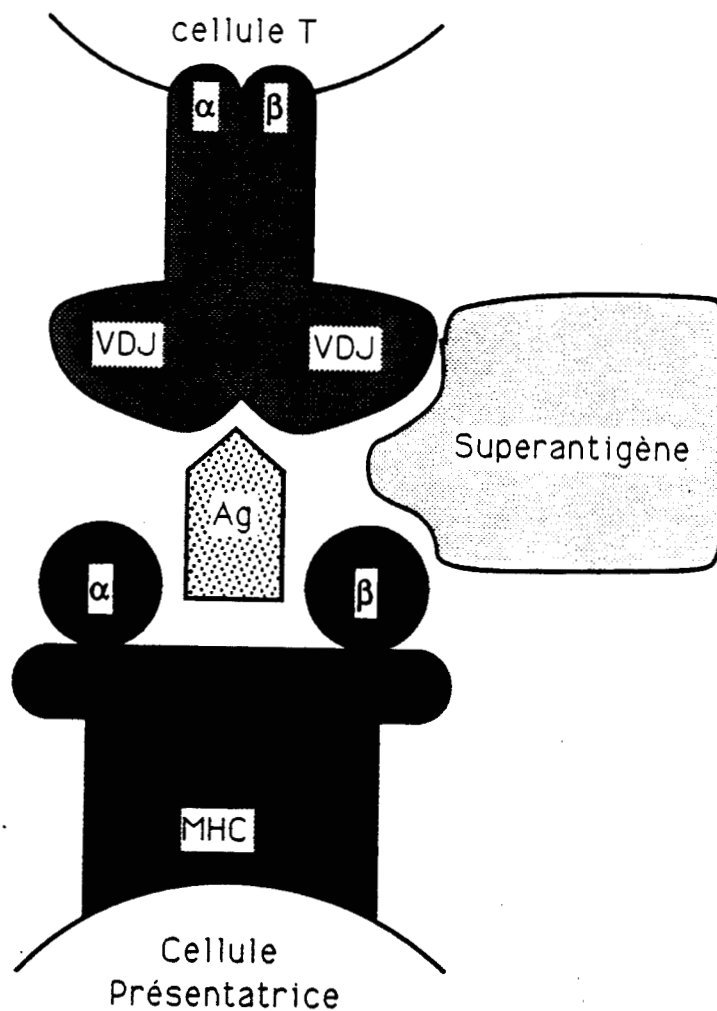


Figure 1 : Structure hypothétique du complexe formé par la molécule de classe II du MHC, le récepteur T et le superantigène. Le schéma montre une molécule de classe II en contact avec un récepteur T et une molécule de superantigène. L'antigène est figuré dans le site probable de fixation d'un peptide antigénique conventionnel.

montrent que la fixation de la ESB sur les molécule de classe II n'empêche pas celles-ci de présenter un peptide antigénique à des cellules T (170). Toute les toxines ne se fixent pas avec la même affinité sur toutes les molécules de classe II. Des expériences de fixation de molécules radiomarquée , de coprécipitation et de stimulation de lymphocytes T (182) indiquent que les toxines se fixent bien sur les molécules DR, moins bien sur les molécules DQ et apparemment pas du tout sur les molécules DP. Chez la souris on retrouve le même résultat : une bonne fixation sur les molécule I-E (équivalentes des molécules DR) et une moins bonne fixation sur les molécules I-A (équivalentes des molécules DQ humaines)(170).

•3. Les toxines se fixent sur les parties V β du TCR.

Si les toxines activent les lymphocytes T, elles n'agissent pas comme des lectines. Elles stimulent un pourcentage plus faible de cellules et ne sont pas capables de stimuler certains clones (183-185). De plus, leurs potentialités mitogéniques nécessitent la présence de cellules exprimant des molécules de classe II du CMH. En fait, ces toxines stimulent les cellules T via les régions V β du TCR. Ainsi chez l'homme, la ESB stimule uniquement les cellules porteuses des V β 3, 12, 14, 15, 17 et 20. La spécificité de la toxine est uniquement portée par la partie V β , les autres parties du TCR ne sont pas impliquées dans cette fixation (186,187). La spécificité des différentes toxines pour les V β est montrée dans le tableau suivant (170):

Toxine	spécificité V β	
	Homme	Souris
SEA	?	1,3,10,11,17
SEE	5,1,6,1-3,8,18	11,15,17
SED	5,12,?	3,7,8,1-3,11,17
SEB	3,12,14,15,17,20	3,7,8,1-3,17
SEC1	12,?	3,8,2,8,3,11,17
SEC2	12,13,1,13,2,14,15,17,20	3,8,2,10,17
SEC3	5,12,?	3,7,8,1,8,2
TSST1	2	3,15,17
EXFT	2	3,10,11,15,17
MAM	?	6,8,1,8,2,8,3

Mais cette situation n'est pas aussi simple. Par exemple, il n'est pas possible d'activer directement les cellules T avec des toxines même lorsque celles-ci sont fixées au fond des plaques de cultures. La nécessité des molécules de classe II du CMH peut s'expliquer de deux façon non exclusives.

-Soit la toxine seule est incapable de se fixer sur le TCR, elle doit donc subir un changement de conformation lors de son interaction avec les molécules du CMH-II lui permettant de se fixer sur les TCR. Ce cas de figure se retrouve lors de l'interaction du TCR avec le complexe antigène-CMH. En effet ni la molécule du CMH, ni le peptide antigénique séparés ne sont capables de se fixer sur la cellule T, seul le complexe se fixe sur le TCR.

-Soit, comme dans le cas d'une activation induite par des anticorps CD3, la mobilisation du complexe TCR-CD3 ne suffit pas et il faut y ajouter les signaux d'activation fournis par les molécules présentes à la surface des cellules accessoires. Dans ce cas, ce n'est plus la molécule de classe II du CMH qui est nécessaire mais la cellule porteuse de cette molécule. Des expériences utilisant soit des molécules du CMH solubles ou insérées dans des bicouches lipidiques soit des cellules se comportant comme des APC strictes, comme les fibroblastes traités à l'interféron γ permettraient de bien séparer ces deux solutions.

•4. Des protéines virales se comportent comme des "superantigènes"

En 1973, Festenstein (188) montra qu'en mélangeant les cellules spléniques de deux types de souris présentant pourtant les mêmes CMH, on pouvait observer une prolifération. Les antigènes ainsi mis en évidence furent appelés Mls pour minor lymphocytes stimulating antigens. Par la suite, d'autres antigènes Mls furent découverts chez la souris : les antigènes Mls 1^a, 2^a et 3^a se fixent sur les molécules de classe II (sauf dans l'haplotype q) et se présentent sous la forme de 2 allèles a et b, ainsi qu'au moins 4 autres antigènes Mls produits par les cellules B et qui se fixent sur les molécules I-E de toutes les souris (189). Bien que l'équivalent de ces antigènes n'ait jamais pu être mis en évidence chez l'homme, de nombreuses théories ont tenté de trouver un rôle physiologique à ces "superantigènes" endogènes (170).

Tout récemment, la découverte (190-193) de l'origine rétrovirale de ces molécules a tout remis en question. En effet, L'équipe de P. Marrack décrit

un nouveau superantigène qui est transmis verticalement dans des lignées murines connues pour leur transmission active du virus des tumeurs mammaires de souris (MMTV). Les souris débarrassées de ce retrovirus n'expriment plus le superantigène. Il existe donc un lien entre le MMTV et les superantigènes. Les équipes de Frankel W.N., Palmer E. et Tomonari ont montré indépendamment que des superantigènes endogènes impliqués dans des délétions clonales au sein du thymus étaient génétiquement inséparables de séquences rétrovirales endogènes faisant partie de la famille des MTV.

D'autre part, un autre superantigène d'origine rétrovirale a été mis en cause dans la pathogénie d'un syndrome d'immunodéficience chez la souris.

•5. Mise en évidence d'un superantigène dans un modèle de SIDA murin.

L'infection de certaines souches murines avec un mélange de virus répliquant-compétent et répliquant-incompétent du virus de la leucémie murine (MuLV) entraîne un syndrome d'immunodéficience acquise appelé MAIDS par les anglosaxons. Ce syndrome est caractérisé par une activation polyclonale des lymphocytes T et B suivie d'une immunodéficience, d'une régulation anormale de la synthèse de cytokines et de la formation tardive de lymphomes B chez certains animaux. En étudiant ces lymphomes B, l'équipe de H.C. Morse III (194) a pu montrer que certains d'entre-eux étaient capables de stimuler les lymphocytes T. Cette activation est restreinte aux cellules CD4⁺ porteuses du Vβ5, une caractéristique des superantigènes. D'autre part, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines virales a permis de montrer que la protéine gag de 65 kDa du virus défectif était responsable de ce phénomène.

Des molécules de type "superantigène" n'ont pas pu être mises en évidence dans le cas du virus de l'immunodéficience humaine. Par contre ce modèle murin d'immunodéficience peut nous permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie humaine. On sait (195) que l'injection de "superantigènes" comme la ESB entraîne chez la souris, une phase de prolifération des cellules CD4⁺ suivie très rapidement par une diminution du nombre de ces cellules victimes d'un phénomène d'apoptose (cf infra). Ainsi, même si le mécanisme d'induction peut-être différent, le déclenchement d'une mort programmée dans les cellules CD4⁺

par le VIH pourrait être à l'origine du syndrome d'immunodéficience (cf infra).

L'APOPTOSE DANS LE SYSTEME IMMUNITAIRE

F] L'apoptose dans le système immunitaire

La mort cellulaire est un phénomène essentiel non seulement lors du développement embryonnaire, du remaniement de certain organes, de la sélection des cellules compétentes dans le système immunitaire ou du vieillissement mais aussi dans des processus pathologiques comme les maladies dégénératives.

La mort cellulaire peut survenir par nécrose, par apoptose et peut-être même par d'autres mécanismes discutés par Wyllie A.H.(196). Dans la nécrose, les cellules meurent fréquemment par groupe probablement parce que l'ischémie et l'hypoxie en sont des stimuli déclencheurs fréquents. La membrane plasmique perd progressivement sa perméabilité sélective et on observe une perte du matériel intracellulaire. Ces protéines, notamment certaines protéines mitochondriales activent le complément et déclenchent une réaction inflammatoire dans le tissu sain adjacent.

L'apoptose survient dans tous les cas où la mort est physiologique :

- durant l'embryogénèse,
- dans des tissus adultes en voie d'atrophie suite à des actions hormonales ou autres,
- dans les cibles des cellules T cytotoxiques
- et lors de la maturation des lymphocytes T dans le thymus et des lymphocytes B dans les centres germinatifs des ganglions.

Ce terme a été choisit pour distinguer ce type de mort cellulaire de la nécrose et pour montrer son caractère particulier de mort programmée physiologique. En effet "apoptosis" dérive du mot grec utilisé pour décrire "la chute des feuilles des arbres".

Au cours du phénomène d'apoptose, la densité des cellules augmente avec une exportation du contenu de la cellule et une diminution du volume cytoplasmique. On remarque la dilatation du réticulum endoplasmique, la formation de bulles à la surface de la cellule et la rupture de la cellule en fragments qui conservent une membrane plasmique intacte. La chromatine se condense, le centre fibrillaire et les portions granulaires du nucléole se séparent les uns des autres. Dans les tissus, les cellules apoptotiques ne provoquent pas de réactions inflammatoires mais sont rapidement reconnues et phagocytées par les macrophages ou d'autres cellules voisines (197).

Les stimuli qui induisent ces changements varient d'un type cellulaire à l'autre, mais nombre d'entre eux sont d'ordre physiologique et certains peuvent-être inhibés par divers agents inhibant la synthèse protéique dont la cycloheximide et l'actinomycine D.

Les changements nucléaires sont presque certainement provoqués par l'activation d'une endonucléase qui clive l'ADN dans les zones de fragilité entre les nucléosomes donnant le profil caractéristique en électrophorèse d'un ADN fragmenté en multiples de 200 paires de bases (représentant la longueur d'un nucléosome).

• 1. L'apoptose dans la sélection du répertoire T au sein du thymus.

La découverte de cellules apoptotiques dans le thymus a suggéré que le mécanisme de mort cellulaire programmée connu dans l'embryogénèse était un phénomène plus général participant à certains mécanismes régulateurs.

Lors^A du développement thymique, les cellules autoréactives capables de reconnaître des antigènes du soi doivent être éliminées. Le mécanisme de sélection le plus logique est d'induire la mort de la cellule lors de la reconnaissance de l'antigène. Dans ces conditions le mécanisme d'apoptose, parce qu'il épargne les cellules adjacentes serait le plus approprié. Nous allons analyser ici les données qui ont permis de confirmer cette hypothèse.

• 1.1. La première découverte de thymocytes apoptotiques.

En 1980, Wyllie (198) montrait que des thymocytes traités à la méthylprednisolone *in vitro* mouraient par un phénomène d'apoptose. Le glucocorticoïde induisait l'activation d'une endonucléase capable de fragmenter l'ADN des thymocytes en multiples de 200 paires de bases. Dans des études ultérieures, il caractérise mieux la morphologie et les propriétés de ces thymocytes apoptotiques (199). Ces cellules deviennent plus denses, la chromatine fragmentée se condense et le cytoplasme se réduit. Ce phénomène était décrit alors comme un mécanisme général d'involution des organes sous une influence hormonale.

Il a fallu attendre 1989 pour voir apparaître les premières descriptions de l'implication de ce phénomène dans la maturation des cellules T au sein du thymus

•1.2. Des anticorps CD3 induisent une mort par apoptose dans les thymocytes immatures.

Lorsque C.A. Smith et ses coll. (200) ont commencé leurs travaux on savait déjà que les cellules autoréactives au sein du thymus étaient éliminées par un mécanisme inconnu (201,202). De plus si les anticorps CD3 sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T matures, il ne font pas proliférer les thymocytes. Pourtant ces anticorps induisent dans les thymocytes une augmentation du Ca^{2+} intracytoplasmique, un second messenger capable d'induire l'apoptose (203). Dans des cultures de lobes thymiques, des anticorps CD3 induisent la mort d'environ 45% des cellules. Cette mort est accompagnée d'une fragmentation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases et touche presque exclusivement les cellules immatures $CD4^+8^+$. Ces travaux ont été par la suite confirmé par D.J. McConkey et coll. (204) qui montrent en outre que l'addition d'un activateur de la PKC est capable d'inhiber l'apoptose induite par les anticorps CD3 ou le Ca^{2+} ionophore et permet la prolifération des thymocytes, et par Y. Shi et coll. (205) qui montrent aussi que la cyclosporine A est capable d'inhiber ce phénomène.

•1.3. Les superantigènes et les antigènes sont capables d'induire l'apoptose dans les thymocytes immatures.

L'induction de l'apoptose par l'activation du complexe CD3-TCR dans les thymocytes immatures peut également être mise en évidence en utilisant des "superantigènes" comme la ESB. Ainsi E.J. Jenkinson et ses collaborateurs ont pu montrer que l'addition de ESB sur des cultures de lobes thymiques induisait une dégradation du DNA en fragments de 200 paires de bases et que l'on observait une disparition des cellules portant le $V\beta 8$ reconnu par la ESB (206).

Plus récemment, en utilisant des souris transgéniques pour un récepteur T reconnaissant un peptide particulier, Murphy a pu montrer que l'injection de ce peptide induit la mort par apoptose de thymocytes et la disparition des cellules porteuses du transgène (207). Ainsi, la reconnaissance de l'antigène par les cellules thymiques immatures conduit à leur suicide par un processus d'apoptose.

•2. Les signaux d'activation entraînant l'apoptose

Le déclenchement de l'apoptose dans les thymocytes immatures peut se faire en utilisant les glucocorticoïdes, les Ca^{2+} ionophores et l'antigène ou des anticorps CD3. Tous ces stimuli ont pour caractéristique commune d'augmenter durablement la concentration de Ca^{2+} intracellulaire. Nous avons vu que lors de l'activation des lymphocytes T matures, le signal calcique (fournit par exemple par les anticorps CD3) doit être complété par une activation de la PKC (fournit par l'IL1 ou les molécules présentes à la surface des cellules accessoires). Il n'est donc pas étonnant que l'addition de PMA (un activateur de la PKC) ou d'IL1 soit capable d'inhiber l'induction de l'apoptose et de permettre la prolifération des thymocytes immatures (208). Il existe un autre second signal dans l'activation des lymphocytes T, le cAMP qui lorsqu'il est seul fournit un signal négatif alors qu'en conjonction avec une activation de la PKC il permet l'activation de la cellule. Or l'augmentation du cAMP dans les thymocytes immatures induit leur mort par apoptose et l'addition d'IL1 qui active la PKC inhibe ce phénomène (209). Ces observations ont conduit l'équipe de D.J. McConkey à présenter un modèle dans lequel l'activation incomplète des thymocytes entraîne leur mort par apoptose alors que l'addition d'un second signal permet leur activation (210).

Cette hypothèse est confortée par la démonstration récente selon laquelle si les cellules épithéliales du cortex thymique sont capables de présenter correctement l'antigène (211), elles sont incapables de fournir les signaux accessoires permettant d'activer la PKC et donc de faire proliférer les cellules T matures. Il est à noter pourtant qu'il est possible d'induire l'apoptose des thymocytes immatures en utilisant des APC issus d'une rate fournissant un signal complet. (212). La capacité à subir l'apoptose proviendrait donc plus d'un défaut du thymocyte à recevoir un signal complet qu'à une mauvaise présentation de l'antigène par les cellules épithéliales du cortex, les deux événements pouvant évidemment être concomitants.

•3. La mort cellulaire programmée dans le système immunitaire.

Les cellules du système immunitaire se renouvellent et subissent des transformations tout au long de la vie. Il existe un certain nombre d'étapes

dans la maturation et le fonctionnement du système immunitaire au cours desquelles les cellules sont susceptibles de mourir par des processus physiologiques programmés. Nous allons examiner plusieurs de ces mécanismes.

•3.1. L'activation des hybridomes T par le TCR provoque l'apoptose

Les hybridomes T résultent de la fusion entre des cellules T normales et une lignée cellulaire thymique immature. L'activation de ces cellules par des anticorps dirigés contre le complexe CD3-TCR induit leur mort par apoptose. Dans ces cellules, la dexaméthasone provoque également l'apoptose. De façon surprenante, Ashwell a trouvé que le traitement simultané par ces deux facteurs n'induit pas l'apoptose. Les deux voies d'induction doivent donc être différentes et antagonistes. Pourtant le traitement par les anticorps CD3 n'inhibe pas la translocation du récepteur aux glucocorticoïdes vers le noyau de la cellule ni la transcription d'un vecteur d'expression portant des séquences de réponse aux glucocorticoïdes.(213).

•3.2. Maturation des cellules B lors de la réponse anticorps.

Les lymphocytes B naïfs répondent à un antigène en proliférant, et chaque division cellulaire s'accompagne d'un taux significatif de mutation au niveau des loci codant les immunoglobulines. Les cellules nouvellement mutées ont une probabilité élevée de mourir par apoptose sauf si leur survie est stimulée probablement par l'antigène. Dans les ganglions, ce sont les cellules folliculaires dendritiques qui présentent les antigènes aux lymphocytes voisins. A la suite d'une stimulation antigénique in vivo, on observe de nombreuses cellules B en division au niveau du centre folliculaire, ainsi qu'un certain degré d'apoptose. Les cellules B d'un follicule peuvent toutes provenir d'un précurseur unique. Les cellules B situées au centre du follicule, les centrocytes, donneront naissance, après une stimulation antigénique, aux cellules plasmiques qui sortiront du ganglion. Si les centrocytes ne rencontrent pas d'antigène à ce moment, elles meurent par apoptose. Liu et coll. ont pu montrer que les centrocytes humains isolés en culture en dehors de toute stimulation meurent tous par apoptose. Leur survie peut-être améliorée par l'activation

avec une anti-immunoglobuline M (mimant l'antigène) (214). Les anticorps CD40 favorisent également la survie et la différenciation de ces cellules. En utilisant ces anticorps en conjonction avec de l'IL4, Banchereau et al. sont même parvenu à produire des cultures à long terme de lymphocytes B normaux (215,216).

•3.3. Les facteurs de croissance agissent en prévenant l'apoptose.

La culture in vitro de cellules souches hématopoïétiques et de certaines lignées cellulaires n'est réalisée qu'en ajoutant à la culture cellulaire différents facteurs de croissance. Lorsque ces cellules sont privées de ces facteurs de croissances elles meurent activement par apoptose (217-219). Cette mortalité cellulaire qui peut-être inhibée par la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse proteique, est un phénomène actif nécessitant la synthèse de protéines.

•3.4 Le gène bcl-2 : un oncogène capable de prévenir l'apoptose.

Les différentes translocations chromosomiques sont souvent associées à des lymphomes particulier. La translocation chromosomique la plus souvent associée à des lymphomes B humain est la translocation t[14;18][q32;q21] retrouvée dans à peu près 85% des lymphomes B folliculaires et 20% des lymphomes B diffus. Cette translocation se produit au cours du développement des cellules pré-B au moment du réarrangement des gènes des immunoglobulines. Le résultat de cette translocation est d'ammener le gène codant pour bcl-2 à coté du gène codant pour les chaines lourdes des immunoglobulines. On observe alors la production d'un ARNm hybride bcl-2-Ig et la synthèse de la protéine bcl-2 de 25 kDa. Jusqu'à récemment l'oncogénécité de bcl-2 n'était pas connue. Des expérience de transfections ont permis de savoir que le gène bcl-2 permettait la survie des cellules hématopoïétiques privées de leur facteur de croissance (dans ce cas il s'agissait d'une cellule myeloïde dépendante de l'IL3) et, en coopération avec l'oncogène c-myc, d'immortaliser les cellules pré-B (220). Ces résultats ont par la suite étaient confirmés, d'une part l'utilisation de souris transgénique a permis de montrer que la coopération des gènes bcl-2 et c-myc induisait des tumeurs lymphoïdes (221). Le gène bcl-2 agit en

prolongeant la survie des cellules B et le gène c-myc induit leur prolifération continue.

D'autre part des expériences de transfection du gène bcl-2 dans différentes lignées dépendantes de facteurs de croissance ont permis de montrer que son effet sur la survie des lignées était assez général (il prolonge la survie des lignées lymphoïdes, myeloïdes ou mastocytaires dépendantes de l'IL3, du GM-CSF, ou de l'IL4) mais non universel (il n'empêche pas la mort des lignées lymphoïdes dépendantes de l'IL2 ni celle des myelomes dépendant de l'IL6)(222).

•3.5. cytolyse médiée par les lymphocytes.

On connaît à l'heure actuelle 3 mécanismes par lesquels les lymphocytes pourraient tuer leurs cellules cibles :

-un mécanisme nécessitant une interaction directe entre la cellule cible et la cellule effectrice, qui pourrait résulter en l'insertion de molécules formant des pores : les perforines, dans la membrane cytoplasmique des cibles.

-l'interaction directe entre le lymphocyte et sa cible provoquant l'apoptose de cette dernière par un ou des mécanisme(s) perforines-indépendant(s). Ce processus, cependant diffère de l'apoptose décrite dans d'autres situations, par exemple dans le cas de la lyse des thymocytes induites par les glucocorticoïdes dans le sens où il est plus rapide (quelques minutes au lieu de quelques heures) et qu'il ne nécessite pas la synthèse de protéines. (223,224).

-La production de lymphotoxines par des cellules qui ne doivent pas entrer en contact direct avec la cible, les lymphotoxines induisant alors l'apoptose de certaines cellules (cf infra).

Il se peut que chacun de ces mécanismes lytiques soient actifs dans certaines circonstances, mais aucun d'entre-eux ne peut rendre compte à lui seul de toutes les activités observées. L'activité cytotoxique des phagocytes, qui dépend de la production de molécules toxiques réductrices de l'oxygène, et de l'action d'enzymes lysosomiales, est distincte de ces mécanismes de cytolyse à médiation lymphocytaire.

L'activité cytolytique qui nécessite une interaction directe entre la cible et le lymphocyte effecteur, peut-être assurée par trois types de lymphocytes différents : -les lymphocytes T CD8⁺ qui reconnaissent spécifiquement les

antigènes peptidiques présentés en association avec les molécules de classe I du CMH.

-les lymphocytes T CD4⁺ qui sont activés par les peptides antigéniques associés aux molécules de classe II du CMH.

-Les lymphocytes non-T, non-B, qui sont appelés cellules K ou NK et qui peuvent être activées par l'intermédiaire de leur récepteur pour la partie Fc des Ig G et tuer ainsi des cibles recouvertes d'anticorps ou encore tuer des cibles grâce à leur activité NK (naturel killer). Le système de reconnaissance responsable du déclenchement de l'activité reste obscur.

• 3.6 Le TNF induit l'apoptose dans les cellules tumorales.

La mort cellulaire induite par le TNF α est différente de l'apoptose classiquement décrite dans les autres systèmes cellulaires. L'appellation du TNF α provient de sa capacité à induire une nécrose hémorragique dans certaines tumeurs. Mais le TNF α est également capable de tuer certaines cellules non transformées, il est également reconnu comme un médiateur important dans l'immunité et les processus inflammatoires. La cytotoxicité du TNF pour les lignées cellulaires en culture n'est pas générale et certaines lignées sont résistantes à l'action cytotoxique du TNF. Le TNF induit dans les lignées sensibles une mort cellulaire qui peut prendre les caractéristiques de la nécrose ou celles de l'apoptose suivant les lignées étudiées. Contrairement à l'apoptose décrite lors de la différenciation cellulaire, l'apoptose induite par le TNF n'est pas inhibée par les inhibiteurs de synthèse protéique. Bien au contraire, ces inhibiteurs de synthèse protéique ou d'ARN augmentent la cytotoxicité du TNF et peuvent même rendre sensibles des cellules résistantes comme les fibroblastes. Les cellules résistantes au TNF synthétisent donc des protéines à durée de vie courte qui permettent de protéger la cellule de l'effet cytotoxique du TNF. Parmi ces molécules, le meilleur candidat serait la manganèse super-oxyde dysmutase (Mn SOD) (225). Cette protéine mitochondriale est impliquée dans le "scavenging" des radicaux superoxyde. L'expression plus importante de cette molécule rend les cellules résistantes à l'action combinée du TNF et de la cycloheximide. De plus, l'utilisation d'ARN antisens rend sensibles au TNF des cellules normalement résistantes et ceci en l'absence de cycloheximide. D'autre part, il existe une forte corrélation entre un taux élevé de glutathion intracellulaire, et la résistance de la cellule à l'action cytotoxique du TNF. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la sensibilité

cellulaire au TNF dépend au moins en partie de la capacité de la cellule à limiter les attaques oxydatives ce qui signifie que l'action cytolytique du TNF passe par la formation de superoxydes(226).

• 3.7 Molécules de surface déclanchant la mort cellulaire.

Plusieurs molécules de surface cellulaire, lorsqu'elles fixent leur ligand ou un anticorps sont capables de transduire un signal de mort cellulaire, parmi celles-ci : le récepteur de la cellule T, les immunoglobulines de surface et les récepteurs du TNF sont traités plus haut. Un autre exemple a été décrit par P.H. Krammer (227,228). Ils ont produit un anticorps monoclonal, l'anti-APO-1, qui reconnaît un antigène de surface cellulaire, l'APO-1, d'environ 50 kDa, présent à la surface de nombreuses cellules humaines normales et malignes. L'antigène APO-1 a été purifié et séquencé. Il s'agit d'une nouvelle molécule. L'anti-APO-1 n'induit l'apoptose par pontage de l'antigène APO-1 que dans certaines cellules qui expriment la molécule APO-1. Cette observation s'applique notamment aux cellules T normales activées ainsi qu'à une variété de tumeurs lymphoïdes *in vitro*. Injecté à des souris nu/nu ou SCID portant de larges xénotransplants de tumeurs lymphoïdes humaines, l'anti-APO-1 élimine ces tumeurs en quelques jours. D'après les examens histologiques, le mécanisme de l'élimination de la tumeur *in vivo* semble être l'induction de l'apoptose. Ainsi les travaux sur le système APO-1 pourrait mener d'une part à une compréhension meilleure des bases moléculaires de l'apoptose, et d'autre part à l'utilisation thérapeutique de l'anti-APO-1 contre les tumeurs.

• 3.8 L'apoptose dans les cellules T matures.

On a longtemps cru que seules les cellules T immatures étaient capables de mourir par apoptose. En effet, ni les glucocorticoïdes, ni l'activation du complexe CD3-TCR n'induisent d'apoptose dans les lymphocytes T matures. La seule description de cellules T matures mourant par apoptose a longtemps été celle fournie par Duke (218) sur les lignées T dépendantes de l'IL2.

Récemment, Newell et coll. (229) ont établi dans un modèle murin que l'aggrégation préalable des molécules CD4 par des anticorps monoclonaux, suivie par l'activation de la cellule au moyen d'anticorps dirigés contre le récepteur T entraîne une diminution de l'incorporation de thymidine et la

fragmentation du DNA des cellules. En revanche, l'activation induite par des anticorps CD3 n'est pas modifiée par l'aggrégation des molécules CD4. Bien que le mécanisme par lequel agit la molécule CD4 ne soit pas clair, c'est la première fois qu'il est possible d'induire de l'apoptose dans des cellules T matures au repos. D'autre part, si le rôle physiologique de ce système n'est pas clair, il peut s'appliquer avec quelques réserves au cas de l'immunodéficience humaine. En effet le VIH possède une protéine capable de se fixer sur la molécule CD4 et responsable pour de nombreux auteurs des principaux effets immunosuppresseurs du virus. Il est possible d'imaginer que la molécule gp120 de VIH agglutine les molécules CD4 à la surface des lymphocytes T comme les anticorps CD4 dans le modèle décrit par Newell et coll.(229) et que l'activation ultérieure de la cellule lors de sa rencontre avec l'antigène entraîne sa mort par apoptose.

D'autre part, l'équipe de C.A. Janeway Jr. (230) a utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre le complexe CD3-TCR pour étudier leur effet sur un clone murin T helper de type 1 (Les clones CD4⁺ helper de la souris ont pu être séparés en 2 populations d'après les interleukines qu'ils étaient capables de synthétiser : IL2, IFN γ pour les Th1; IL4, IL5 pour les Th2 (231) en présence ou en l'absence de cellules accessoires. Leurs résultats montrent que la fixation des anticorps sur le TCR en l'absence de cellules accessoires induit une mort cellulaire rapide. Cette mort cellulaire peut-être inhibée par l'addition de cellules accessoires qui permettent alors la prolifération des cellules. La mort est inhibée par la cyclosporine A et des anti-IFN γ et elle est restaurée en ajoutant de l'IFN γ exogène aux cellules traitées par la cyclosporine A. Ces résultats montrent que l'IFN γ joue un rôle important dans la mort cellulaire induite par l'activation via le TCR des cellules blastiques T en l'absence de cellules accessoires. Les auteurs proposent que la mort cellulaire induite des cellule T effectrices soit un troisième mécanisme de tolérance qui s'ajoute à la délétion clonale thymique et à l'inactivation des cellules naïves périphériques par anergie.

•4 Rôles relatifs de l'IFN γ et de l'IL2 dans l'induction d'une mort programmée par apoptose des cellules T à différents stades de différenciation.

Résumé de l'article 4

L'induction de la prolifération des lymphocytes T nécessite à la fois la mobilisation du complexe CD3-TCR et un signal additionnel fourni par les

cellules accessoires. Cependant, la mobilisation du TCR peut conduire à différentes réponses cellulaires en fonction du stade de maturation ou d'activation de la cellule T:

-lors du développement des lymphocytes T dans le thymus, la déplétion des clones autoréactifs se produit, lors de la mobilisation du TCR, par l'induction d'une mort par apoptose. En revanche, si on ajoute des cosignaux comme l'IL1 ou le PMA on induit la prolifération des cellules (208).

-pour les cellules T matures, certains auteurs ont montré que la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal entraîne une anergie des cellules qui ne peuvent plus proliférer en réponse à l'antigène en l'absence d'IL2 exogène(232).

-récemment les équipes de Janeway C.A.(230) et de Russel J. (233) ont montré que la mobilisation du TCR de clones murins T CD4⁺ (pour Janeway C.A.) ou T CD8⁺ (pour Russel J.) en l'absence de cellules accessoires entraînait leur mort par apoptose. Cette induction peut-être inhibée par l'addition de cellules accessoires, par la cyclosporine A et par des anti-IFN γ .

Nous avons tenté, dans un modèle humain de mieux comprendre ces différentes modalités d'induction d'une mort cellulaire par apoptose dans des cellules T.

Nous avons étudié l'effet de la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans quatre types cellulaires :

- des thymocytes matures (phénotype CD4⁺8⁻ ou 4⁻8⁺)
- des lymphocytes T du sang périphérique (PBLT)
- des lymphoblastes PHA (phénotype CD4⁺8⁻ ou 4⁻8⁺)
- des lignées T dépendantes de l'antigène (phénotype CD4⁺8⁻)

Nous avons pu mettre en évidence que :

-La mobilisation du complexe CD3-TCR (réalisée par des anticorps CD3 fixés au fond des plaques de culture) entraîne la mort par apoptose dans les thymocytes, les lymphoblastes et les lignées T, alors que les PBLT restent apparemment au repos sans signes de mort cellulaire.

-Cette mort est inhibée par l'IL1, l'IL2 et les cellules accessoires (qui permettent également la prolifération des cellules) ; et par la cyclosporine A et les anti-IFN γ . Ces résultats confirment donc ceux obtenus chez la souris.

Pour mieux comprendre le rôle joué par les différentes interleukines dans l'induction de la mort par apoptose des lymphocytes T, nous avons étudié leur synthèse lors de la mobilisation du TCR.

-La mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans les thymocytes matures et les lymphoblastes induit la synthèse d'IFN γ (mise en évidence par dosage dans les surnageants de culture et par northern blot) mais pas celle d'IL2. Par contre l'addition du cosignal (ici l'IL1) permet la synthèse d'IL2 qui entraîne la prolifération des cellules. En revanche, la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal dans les PBL T au repos n'entraîne pas de synthèse d'IFN γ , l'addition d'IL1 permet la synthèse d'IL2 et d'IFN γ induisant la prolifération des cellules.

La CsA ayant pour propriété d'inhiber la synthèse des interleukines sans inhiber l'expression de leur récepteur par exemple le récepteur pour l'IL2, nous l'avons utilisée pour mieux cerner l'effet de l'IL2 et de l'IFN γ sur ces différents types cellulaires que nous avons cultivés en présence d'anticorps CD3 fixés et de CsA. Nous n'avons observé ni synthèse d'interleukines, ni prolifération, ni mort cellulaire. L'addition d'IL2 permet la prolifération de ces différents types cellulaires alors que l'addition d'IFN γ induit une mort cellulaire par apoptose. De plus, même sur des PBLT stimulés par des anticorps CD3 en présence de monocytes, l'addition conjointe de CsA et d'IFN γ entraîne la mort des cellules par apoptose, alors que l'addition d'IL2 permet leur prolifération.

Ces résultats permettent d'envisager un modèle où sur des cellules T activées, la présence d'IFN γ en l'absence d'IL2 induirait une mort cellulaire par apoptose.

En résumé, nous avons étudié trois modèles différents d'induction de l'apoptose dans les cellules T à différents stades de maturation ou d'activation. Dans chacun de ces modèles, il existe un mécanisme commun d'induction qui nécessite la présence, sur les cellules activées, d'IFN γ en l'absence de sécrétion d'IL2. Cette condition est réalisée soit par le retrait de l'IL2, soit par une activation incomplète de la cellule lui permettant de synthétiser de l'IFN γ et pas d'IL2. D'autre part la connaissance de ces différents modèles d'induction d'une mort cellulaire *in vitro* peut avoir une certaine importance dans la compréhension de certains phénomènes physiologiques :

-La sélection clonale dans le thymus et son rapport avec l'induction d'une mort programmée par apoptose a déjà été longuement étudié.

-L'induction d'une mort cellulaire par apoptose après retrait d'un facteur de croissance a elle aussi été longuement décrite mais dans le cas particulier des cellules T ce phénomène peut très bien avoir une importance physiologique. En effet, lors de l'activation des cellules *in vivo*, il existe

souvent une activation des cellules voisines dûe à la sécrétion de cytokines. On peut donc penser que ces cellules en l'absence d'un stimulus ultérieur sont éliminées par un phénomène de suicide (l'apoptose) et n'interf erent pas avec la réponse spécifique à l'antigène.

-La présentation de l'antigène en l'absence de signaux accessoires est une caractéristique des cellules tissulaires non lymphoïdes. Notre observation montrant le suicide des lymphocytes activ es lors de la mobilisation du TCR en l'absence de cosignal suggère que ce mécanisme peut jouer un rôle dans l'élimination des lymphocytes dirig es contre des antigènes tissulaires. Ce mécanisme, avec la délétion clonale thymique et l'anergie périphérique des cellules naïves, serait un troisième mécanisme servant à éliminer les cellules autoréactives.

IFN γ gene expression in the absence of IL-2 gene expression: a mechanism involved in CD3-mediated apoptosis of human mature thymocytes and mature activated peripheral T cells.

By Hervé Groux*, Didier Monté*, Bénédicte Plouvier*, André Capron* and Jean-Claude Ameisen*

*From *Unité INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille, France.*

Running foot : Role of IL2 and IFN γ in T cell apoptosis

Address correspondance to Groux Hervé,
Unité mixte INSERM U1647-CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Pr.
Calmette 59019 Lille, France. Tel : 20 87 78 90 ; Fax : 20 87 78 88.

Summary

Mobilization of the CD3/TCR complex of CD4-CD8 single positive mature medullary human thymocytes leads to an activation-induced cell death process by apoptosis. We observed that apoptosis could also be induced in human mature activated T cell lines by CD3 mobilization in the absence of accessory cells. In both cases, apoptosis was associated with IFN γ gene expression and secretion in the absence of IL-2 gene expression and secretion. Addition of anti-IFN γ antibody prevented cell death, but did not lead to a proliferative response to CD3. Addition of IL-2 both prevented death by apoptosis and allowed proliferation to CD3 mAb, without modifying IFN γ secretion. Addition of IL-1 had the same effect, and was shown to induce gene expression and secretion of IL-2. CD3-mediated apoptosis was prevented by cyclosporin A (CsA). Addition to CsA-treated cells of IFN γ induced apoptosis, and addition of both IFN γ and IL-2 prevented apoptosis and allowed T cell proliferation to CD3. These results suggest that the uncoupling of IFN γ and IL-2 gene expression following CD3/TCR mobilization plays a similar role in apoptosis of human T cells at different developmental and activation stages. We propose that cosignals provided by accessory cells are needed to allow a coupling of IL-2 gene and IFN γ gene expression, and that an essential role of IL-2 secretion in T cell activation and proliferation involves the inhibition of the death program under the control of IFN γ .

An important question in T cell biology is how TCR mobilization can lead to a variety of consequences, depending on the developmental stage of the T cell, and on the nature of cosignals provided by accessory cells. In mature peripheral T cells, the presence of second signals provided by antigen presenting cells (APC), including IL-1, leads to cell proliferation (1-3); the absence of cosignal leading to anergy (4-7), a mechanism involved in the prevention of autoreactive response in peripheral T cells. Whereas, in thymocytes, TCR mobilization can lead to the induction of programmed cell death by apoptosis, a process accounting for the negative selection of the TCR, that participates into the establishment of self-tolerance (8-10). Recent evidences obtained *in vitro* and *in vivo* in murine and human models indicated that activation can also lead, in mature peripheral T cells, to a cell deletion process that has been, in some instances, characterized as apoptosis (11,12). These findings have risen two sets of questions. The first concerns the possible role of activation-induced mature T-cell deletion in the regulation of immune responses, in the maintenance of self-tolerance, and also in the pathogenesis of murine and human retroviral diseases (13,14). Another question concerns the nature of mechanisms involved in activation-induced mature peripheral T-cell death, and their possible relations to those leading to thymocyte apoptosis. Two reports have suggested a role for lymphokines in the response of mature thymocytes and of activated mature peripheral T cells to CD3/TCR mobilization. First, CD3-mediated apoptosis of CD4-CD8 single positive human mature medullary thymocytes can be prevented by addition of IL-2 (15). Second, in mature murine TH1 T-cell clones, CD3/TCR complex mobilization in the absence of accessory cells leads to an activation-induced T cell death process that is prevented by anti-IFN γ antibodies

(16). $\text{IFN}\gamma$, however, is not sufficient to induce T cell death since TCR mobilization in the presence of accessory cells, that leads to T-cell proliferation, is associated with $\text{IFN}\gamma$ secretion.

We have tested the hypothesis that these observations might represent distinct components of a single common mechanism. We report here that $\text{IFN}\gamma$ secretion in the absence of IL-2 gene expression and IL-2 secretion accounts for CD3-mediated death by apoptosis of human mature medullary thymocytes and of human mature activated peripheral T-cell lines.

Material and Methods

Cells : Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy donors. T lymphocytes and adherent cells referred as antigen presenting cells (APC) were purified according to the methods described in (17). Thymuses were obtained from children less than 3 years old, after cardiac surgery; thymocytes were purified on a nylon sieve and frozen until used (18). The medullary thymocytes referred as mature thymocytes were isolated from total thymocyte population by negative selection with magnetic beads (BIOSYS, France) coated with a CD1 monoclonal antibody (D47, IgG1, at 1 $\mu\text{g/ml}$) according to the manufacturer instructions. The purified population was controlled on cytofluorometry and revealed to be 98% single positive CD4 or CD8 cells with 54% CD8⁺ cells and 48% CD4⁺ cells.

PHA lymphoblasts were obtained by stimulating PBMC with PHA (2 $\mu\text{g/ml}$) for 5 days, washed the cells and by adding each 3 days 10 U/ml of recombinant IL2 (rIL2). The cells were used after 1 month of culture and cells revealed to be 98% CD2 positive cells and 72% CD8⁺ cells and 28% CD4⁺ cells.

Tetanus toxoid (TT) dependant cell line, referred as Antigen dependant cell line, were obtained by adding TT at 10 $\mu\text{g/ml}$ to PBMC. After 10 days the cultures were split at 4. 10^4 cell per well (24-well cluster plates-Costar) and rIL2 was added at 10 U/ml final concentration. 6 days later, 2.10^5 blast cells were restimulated with antigen plus 5.10^5 irradiated autologous PBMC. After 3 days of stimulation with antigen the cells were expanded with rIL2 for 3 days. Weekly cycles of antigen stimulation and IL2 expansion were repeated to maintain the lines. The

lines used in these experiments had been maintained in culture for over 2 months and revealed to be 100% CD4⁺ cells..

Cell culture and proliferation assay : The culture medium was RPMI 1640 supplemented with glutamine (2mM), penicilline (200 IU/ml), streptomycin (200 µg/ml), and 10 % fetal calf serum (FCS) except for thymocytes which were maintained in 20% FCS medium. Cultures were carried out in 96-well plates in a final volume of 200 µl maintained at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. The CD3 mAb (X35-7, IgG2a, at 5 µg/ml) was diluted in Tris 0.1 M pH 9.5 and incubated in culture plates (50 µl/well) for 4 hr at 37°C. At the end of the incubation, the plates were washed three times with RPMI 1640 containing 2% FCS and used for cell culture. The cells (5. 10⁴/well) were incubated 3 days for PBMC or thymocytes and 2 days for cell lines in the presence or absence of indicated reagents. The cells were pulsed with 1 µCi [³H] TdR for an additional 12 hr and [³H]-TdR incorporation was determined by liquid scintillation counting.

Evaluation of cell death by trypan blue exclusion

Cells were incubated in 96-well plates coated with mAb or medium for 24 hr for cell lines or 48 hr for thymocytes or PBMC. The cells were harvested by pipetting and diluted 1/2 with 0.1% trypan blue in PBS. The live and dead cells were counted in a hemocytometer and results express as percent of dead cells.

DNA fragmentation assays.

DNA fragmentation was determined according to the methods of Wyllie and Morris (19) and Newell et al. (20) with slight modifications. In brief, 10⁷ cells were collected by centrifugation at 200g for 10mn, and lysed in 1ml hypotonic lysing buffer (5mM Tris Ph 7.4, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X 100). The lysates were centrifuged at 13,000g for 15mn.

Supernatants were deproteinized by extraction once in phenol/chloroform and twice in chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and precipitated at -20°C in 50% isopropanol, 130 mM NaCl; after electrophoresis on 2% agarose slab gels, DNA was stained by ethidium bromide.

Northern and dot blot analysis

Total cellular RNA was extracted from cells by the RNazol (Cinna-Biotex, Frierwood, USA) method according to the manufacturer's instructions. Total RNA ($\pm 10 \mu\text{g}$) samples were size fractionated in 1% agarose formaldehyde gels and transferred to or put on (for dot blot analysis) HYBOND-N filters (Amersham). Filters were hybridized with ^{32}P labelled cDNA probes of IL2-R, IFN γ , IL2 and β actin, and washed with 0.1 SSC, 0.1% SDS at 65°C . Relative sizes of mRNA that hybridized to probes agreed with previously published values.

Determination of cytokines concentrations

IL2 and IFN γ were quantified in culture supernatants by using ELISA kits (Genzyme, Tebu, France) according to the manufacturer instructions.

Monoclonal antibodies and chemicals.

The monoclonal antibodies (mAb) used in this study were CD3 (X35-7, IgG2a), generous gift from Dr. Bourel (France); CD4 (IOT4, IgG2a), CD8 (IOT8, IgG2a), were all purchased from Immunotech, France; CD1 (D47, IgG1) and CD5 (A50, IgG1), generous gifts from Dr. A. Bernard, France. Recombinant cytokine, IL1 α , IL2, IFN γ were purchased from Boehringer Mannheim, France.

Anti-IFN γ rabbit serum was kindly provided by J. Wietzerbin and was tested to inhibit 100 iu at 1/1000 dilution.

Cyclosporin A was purchased from Sandoz, France; Tetanus toxoid antigen from BioMerieux, France, Cycloheximide from Sigma.

Results and discussion

CD3/TCR-mediated cell death by apoptosis in human CD4-CD8 single positive medullary thymocytes.

CD3 mobilization by fixed CD3 mAb did not induce thymocyte proliferation (fig 1a), and led after 48h to death of around 50% thymocytes (fig 1b). In contrast to the CD3 mAb, a CD5 mAb of the same isotype induced no cell proliferation nor cell death (fig 1). Cell death was associated with a DNA fragmentation pattern characteristic of apoptosis (fig 1c), and was an active process prevented by cycloheximide and CsA, as previously reported (21,22) (fig. 1b). As shown in table 1 and fig 2, apoptosis was associated with IFN γ gene expression and IFN γ secretion, with IL-2 R gene expression, and with an absence of IL-2 gene expression and IL-2 secretion. Addition of anti-IFN γ antibody prevented CD3-mediated cell death (fig 1b) and DNA fragmentation (fig 1c) in a dose response manner (fig 3) but was not sufficient to allow thymocyte proliferation to the CD3 antibody (fig 1a). As previously reported (15,23), IL-2 addition, both prevented cell death (fig 1b) and allowed thymocyte to proliferate to the CD3 mAb (fig 1a). Addition of IL-1 to the CD3 mAb allowed IL-2 gene expression (fig 2), and IL-2 secretion (table 1), and thus prevented cell death (24) (fig 1b), and DNA fragmentation (fig 1c), and allowed thymocyte proliferation to the CD3 mAb (fig 1a). Neither IL-1 (table 1, fig 2), nor IL-2 (not shown) affected IFN γ gene expression nor IFN γ secretion in the presence of CD3. Neither IL-1 nor IL-2 induced T-cell proliferation in the absence of CD3 antibody (Fig 1a). In order to further explore the role of IFN γ and IL-2, we investigated thymocytes activated by CD3 mAb

in the presence of CsA. In these conditions, thymocytes were partially activated, as shown by surface expression of the p55 IL-2 receptor chain (not shown), but did not secrete IL-2 nor IFN γ (table 1). As shown in table 1, the sole addition of IL-2 to CsA and CD3 mAb-treated thymocytes, allowed their proliferation. Addition of IFN γ , however, induced T-cell death in the absence of cell proliferation. Finally, addition of both IFN γ and IL-2 allowed cell proliferation in the absence of cell death. The presence of IFN γ was not by itself sufficient to induce apoptosis, since addition of IFN γ to resting thymocytes in the absence of CD3 mobilization did not lead to cell death.

Together these data indicated that CD3 mobilization opens in mature human medullary thymocytes a cell death program that is positively regulated by IFN γ , and inhibited by IL-2 in the presence of IFN γ . We then, investigated whether such a lymphokine-regulated death program was related to the developmental stage of the T cells, or might also be present in mature human peripheral T cells.

CD3-mediated apoptosis of human mature activated T cells in the absence of accessory cells.

Mature T-cell proliferation requires cross-linking of the CD3/TCR complex, and a second signal provided by accessory cells (25). PHA T lymphoblasts and antigen-dependent cell lines proliferated in the absence of accessory cells in response to exogenous IL-2 (10 U/ml). Addition in these conditions of the CD3 mAb lead to a CD3 mAb dose-dependent inhibition of T-cell proliferation (fig 4a), that was associated with the CD3 mAb dose-dependent increase in T-cell death (fig. 4b). Gel electrophoresis of DNA showed that T-cell death was related to induction of apoptosis (fig 4c). Addition of accessory cells (fig 4) of IL-1 (fig 5), or of high amounts of IL-2 (200 U/ml) (fig 5),

allowed T-cell proliferation and prevented T-cell death in response to CD3 mAb. In thymocytes, addition of anti-IFN γ antibody prevented T-cell death without allowing proliferation to CD3 mobilization. As shown in Figure 3 and 5, anti IFN γ antibody inhibits cell death induced by CD3 mAb and can reversed the CD3-induced inhibition of the IL2 response of activated T cells. As shown in fig 6, IFN γ and IL-2 gene expression were similar to what had been observed in mature thymocytes, as well as the preventive effect of IL-1, IL-2 and anti-IFN γ antibody (Fig 5 and 3). To further investigate the role of IFN γ in CD3 induced-cell death of activated T cells and to compare with results obtained on mature thymocytes, , we used the PHA T lymphoblasts 3 days after the addition of IL-2 (10 U/ml), a time at which spontaneous proliferation was very low, and at which almost no exogenous IL-2 remained in the medium. All assays were performed in the absence of accessory cells. In these conditions, also, CD3 mAb induced IFN γ secretion without IL2 secretion and leads to T-cell death in the absence of T-cell proliferation (table 2). Addition of IL1 allowed IL2 secretion and cell proliferation, without affecting IFN γ secretion. Finally, addition of IFN γ , IL-2, or both, on CsA and CD3 mAb-treated activated T cells, gave results similar to those obtained in mature thymocytes.

Induction of cell death by apoptosis in human resting T cells activated with CD3 mAb in the presence of cyclosporine A and IFN γ .

Finally, we investigated resting PBMC containing T cells and accessory cells. CD3 mobilization led to T-cell proliferation, to an absence of cell death, and was associated with IL-2 and IFN γ secretion. As shown in table 2, addition to CD3 mAb of CsA prevented proliferation as well as

IL-2 and IFN γ secretion. As observed in mature thymocytes, and in activated mature T cell lines, addition to CD3 mAb and CsA-treated PBMC of IL-2 led to T-cell proliferation, addition of IFN γ led to T-cell death, and addition of both IFN γ and IL-2 led to T-cell proliferation in the absence of T-cell death.

Together these results indicate that in the absence of cosignals provided by accessory cells, CD3 mobilization leads to an uncoupling of IFN γ and IL-2 gene expression, and induces a death program. This program appears functional in T cells at different developmental and activation stages. A crucial role of IL-1 provided by accessory cells is to allow IL-2 gene expression and IL-2 secretion, an event that without affecting IFN γ secretion, prevents IFN γ -mediated T-cell death. Thus, our results suggest that IL-2 may play 2 simultaneous essential roles that might, or might not involve different mechanisms: the first is to prevent IFN γ -mediated death, the second is to allow a T-cell proliferative response to CD3 mobilization.

Inhibition of T-cell proliferation following CD3/TCR mobilization in the absence of cosignals provided by accessory cells, has been proposed as playing an essential role in the maintenance of self-tolerance (16). It has been shown that in defined circumstances, TCR mobilization in mature TH1 murine clones by MHC-II-dependent antigen in the absence of accessory cosignals, leads to an absence of cell proliferation related to clonal anergy, that is associated with absence of IL-2 gene expression and IL-2 secretion (4). It is a tempting and testable working hypothesis that the induction or absence of induction of IFN γ gene expression following CD3/TCR mobilization in the absence of cosignals might be a crucial event in determining the fate of the T cell, respectively death by apoptosis, or clonal anergy. In this context, the nature of the mechanism involved in tolerance, deletion or anergy,

would depend on the intrinsic capacity of the T cell to synthesize and secrete $\text{IFN}\gamma$ and on the relative ability of the TCR ligand to induce $\text{IFN}\gamma$ secretion. It has been shown that only a subpopulation of murine CD4^+ T cells, the TH1 cells, and maybe human CD4^+ T cells, are able to express $\text{IFN}\gamma$ and IL-2. Liu and Janeway (16) reported that TH2-cell clones in contrast to TH1 clones, did not die in response to CD3 mobilization in the absence of accessory cells. Whether CD3 mobilization in this context led to TH2-cell anergy was not explored.

Interestingly, $\text{IFN}\gamma$ induction enhanced MHC-II expression in lymphoid APC that leads also to induction of MHC-II expression on cells of non lymphoid origin (26), allowing them to present antigens, including self-antigens, to activated T cells. Thus, during the course of an immune response directed against foreign antigens, activated CD4^+ T cells that have the ability to secrete $\text{IFN}\gamma$ are among the most likely to be stimulated by cross-reactive self-antigens presented by non-lymphoid tissue cells that have expressed MHC-II molecules but are unable to provide cosignals (27,28). In this context, autocrine $\text{IFN}\gamma$ -mediated CD4^+ T cell suicide upon such a restimulation might represent a particularly well-adapted mechanism of prevention of auto-immune responses.

The antigen-dependent T-cell line that we have used in our study was almost exclusively of CD4 phenotype. However, the PHA-blast T cell line that we have also used, contained less than 30% of CD4^+ T cells, and a majority of CD8^+ T cells. In this cell line, the percentage of CD3-mediated T-cell death indicated that CD8^+ T-cell death might have occurred. Investigations are under way, using purified CD4^+ and purified CD8^+ T cells from this cell line in order to assess the relative sensitivity to CD3-mediated death in both populations, as well as their lymphokine gene expression and secretion pattern, and the preventive

effect of IL-1 and IL-2. At this stage, we do not know whether the CD8⁺ T cells were able to secrete both IL-2 and IFN γ , or if they depended on IL-2 secreted by CD4⁺ T cells. In general, CD8⁺ T cells have been reported to be able to secrete IFN γ , but not IL-2, and therefore depend on CD4⁺ helper T cells in order to differentiate and to proliferate. Interestingly, the CD8⁺ T cell therefore represent a T cell in which CD3-mediated IFN γ gene expression is constitutively uncoupled from IL-2 gene expression. If IFN γ secreted by activated CD8⁺ T cells induces a cell death program in the absence of paracrine IL-2, the mechanism that we have described may represent a very effective mean by which CD4⁺ T cells exert their control on the extent and duration of CD8⁺ T-cell responses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Bernard and D. Bourel for providing mAbs; J. for flow cytometry analysis; F. Ameisen for helpful discussion. This work was supported by INSERM, CNRS, European Community (TS 2005F); and by a FERS fellowship to H.G.

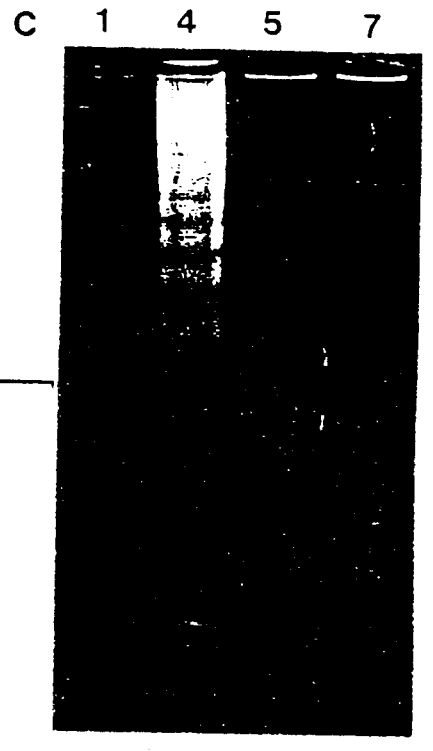
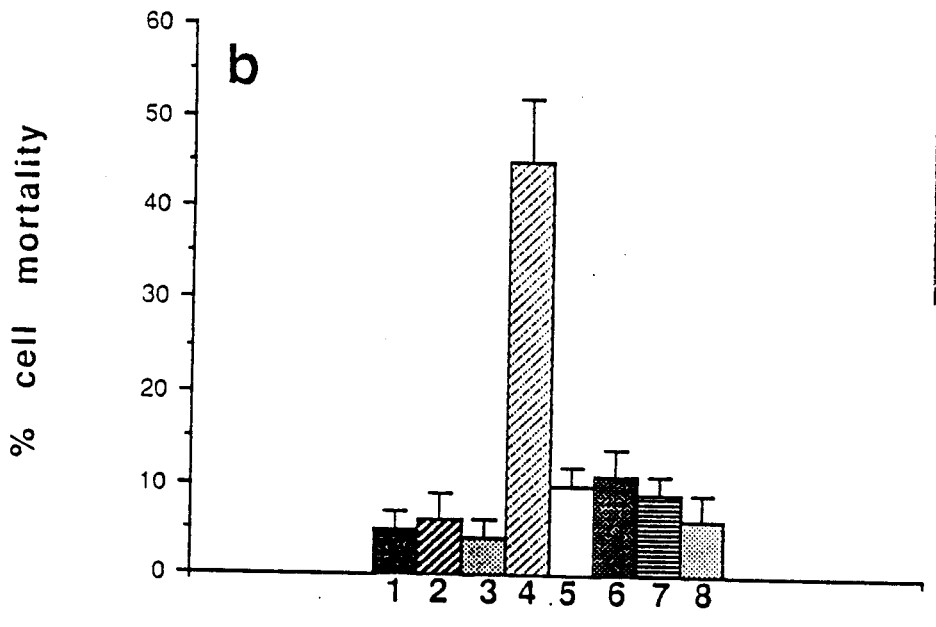
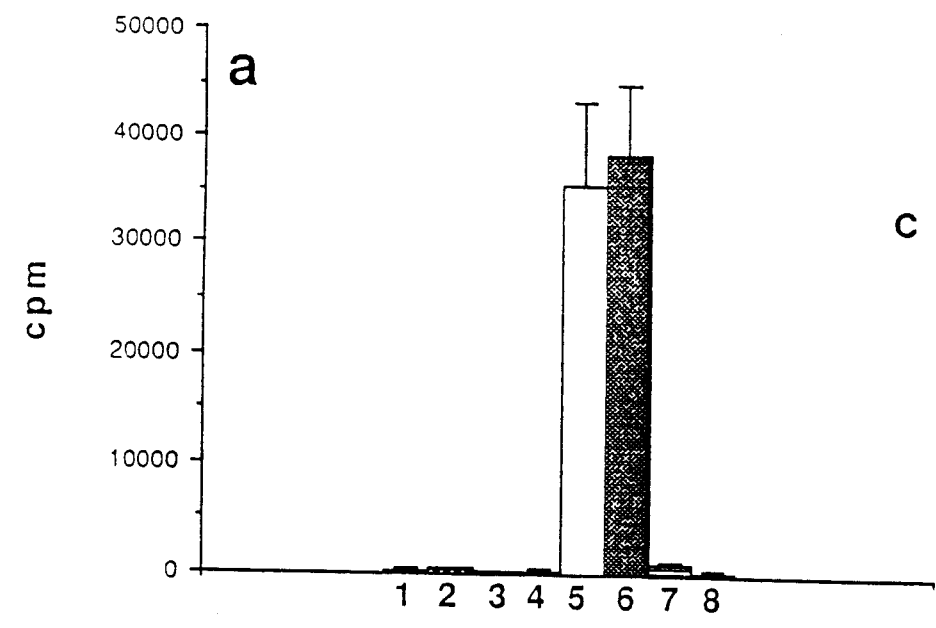
References

- 1) R. Palacios. 1985. Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. *Eur. J. Immunol.* 15 : 645-51.
- 2) Geppert T.D. and P.E. Lipsky. 1986. Accessory cell-T cell interactions involved in anti-CD3-induced T4 and T8 cell proliferation : analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 137 : 3065-72.
- 3) Brottier P., Boumsell L., Gelin C. and A. Bernard. 1985. T-cell activation via CD2 [T, gp50] molecules. Accessory cells are required to trigger T-cell activation via CD2-D66 plus CD2-9.6/T111 epitopes. *J. Immunol.* 135 : 1624-31.
- 4) Jenkins M.K., Pardoll D.M., Mizugushi J., Quill H. and R.H. Schwartz. 1987. T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro : fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95 : 113-133.
- 5) Jenkins M.K., Chen C., Jung G., Mueller D.L. and R.H. Schwartz. 1990. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 144 : 16-22.
- 6) Morahan G., Allison J. and J.F.A.P. Miller. 1989. Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. *Nature* 339 : 622-624.
- 7) Otten G.R. and R.N. Germain. 1991. Split anergy in a CD8⁺ T cell: Receptor-dependant cytotoxicity in the absence of interleukin-2 production. *Science* 251 : 1228-1233.
- 8) Jenkinson E.J., Kingston R., Smith C.A. and J.J.T. Owen. 1989. Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative

- selection of the T cell receptor repertoire. *Eur. J. Immunol.* 19 : 2175-2177.
- 9) Kappler J.W., Roehm N. and P. Murrack. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49 : 273-80.
- 10) Smith C.A., Williams G.T., Kingston R., Jenkinson E.J. and J.T. Owen. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic culture. *Nature.* 337 : 181-184.
- 11) Newell M.K., Haughn L.J., Maroun C.R. and M.H. Julius. 1990. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature.* 347 : 286-288.
- 12) Russel J.H., White C.L., Loh D.Y. and P. Meleedy-Rey. 1991. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc. Acad. Natl. Sci.* 88 : 2151-2155.
- 13) Ameisen, J.C., and A. Capron. 1991. T cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 4, 102-105.
- 14) Groux H., Monte D., Bourrez J.M., Capron A. and J.C. Ameisen. 1991. L'activation des lymphocytes T CD4⁺ de sujets asymptomatiques infectés par le VIH entraîne le déclenchement d'un programme de mort lymphocytaire par apoptose. *C. R. Acad. Sci. Paris* t. 312, Serie III p. 599-606.
- 15) Nieto, M.A., Gonzalez, A., Lopez-Rivas, A., Diaz-Espada, F., and F. Gambon, 1990. IL2 protects against anti-CD3 induced cell death in human medullary thymocytes. *J. Immunol.* 145, 1364-1368
- 16) Liu, Y., and C. Janeway . 1990. Interferon γ plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 172, 1735-1739

- 17) Groux H., Huet, S., Valentin, H., Pham, D., and A. Bernard. 1989. Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by the CD29 molecule of CD4+ lymphocytes. *Nature* 339, 152-154
- 18) Huet, S., Groux, H., Caillou, B., Valentin, H., Prieur, A.M., and A. Bernard. 1989. CD44 contributes to T cell activation. *J. Immunol.* 143, 798-801
- 19) Wyllie, A.H., and R.G. Morris. 1982. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment *Am. J. Pathol.* 109, 78-87
- 20) Duke R.C. and J.J. Cohen. 1986. IL2 adiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependant T cells. *Lymph. Res.* 5 : 289-299.
- 21) Shi, Y., Sahai, B.M., and D.R. Green. 1989. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridoma ad thymocytes. *Nature* 339, 625-626
- 22) Nieto M.A. and A. Lopez-Rivas. 1989. IL2 protects T lymphocytes from glucocorticoid-induced DNA fragmentation and cell death. *J. Immunol.* 143 : 4166-4170.
- 23) McConkey D.J., Hartzell P., Chow S.C., Orrenius S. and M. Jondal. 1990. Interleukine 1 inhibits T cell receptor-mediated apoptosis in immature thymocytes. *J. Biol. Chem.* 265 : 3009-3011.
- 24) Van Wauwe J., J. Goosens. 1981. Mitogenic actions of orthoclone OKT3 on human peripheral blood lymphocytes : effects of monocytes and sérum componants. *Int. J. Immunopharmacol.* 3 : 203-9.
- 25) Burkly L.C., Lo D., Kanagawa O., Brinster R.L. and R.A. Flavell. 1989. T-cell tolerance by clonal anergy in transgenic mice with nonlymphoid expression of MHC class II I-E. *Nature* 342 : 564-566.

- 26) Pober J., Collings T., Gimbrone M., Cotran R., Gitlin J., Fiers W., Clayberger C., Kresky A., Burakoff S. & Reiss C.-1983- Lymphocytes recognize human vascular endothelial and dermal fibroblasts Ia antigens induced by recombinant immune interferon. *Nature*. 305 : 726-9.
- 27) Geppert T.D., Lipski P.E.-1985- Antigen expression by gamma-interferon-treated endothelial cells and fibroblasts : differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *J. Immunol.* 135 : 3750-61.
- 28) Geppert T.D., Lipski P.E.-1987- Dissection of defective antigen presentation by interferon-gamma-treated fibroblasts. *J. Immunol.* 138 : 385-92.



Legends

Figure 1 : Action of IL1, IL2, anti-IFN γ and cycloheximide on the proliferative response and cell death induction by plate-bound CD3 mAb of mature thymocytes.

Cells were purified as described in Material and Methods and cultivated in medium alone (1) or in medium supplemented with IL2 (10 U/ml)(2) and activated with plate-bound CD5 mAb as control (3) or plate-bound CD3 mAb (4-8) in the presence of rIL1a (50 U/ml, 5), rIL2 (10 U/ml, 6), anti-IFN γ (1/800 serum dilution, 7) or cycloheximide (50 μ g/ml,8).

a) Cell proliferation was determined by 3 [H]-TdR incorporation. Thymidine was added the last 12 hr of day 3. Results represent mean of triplicate culture \pm SD of one representative experiment out of 6.

b) Cell death was determined 48 hr after stimulation by trypan blue exclusion. Results shown are percentage of cell death of one representative experiment out of 4.

c)Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from mature thymocytes after different stimulations. Mature thymocytes were cultivated in medium alone (lane 1) or stimulated by plate-bound CD3 mAb (lane 4,5,7) with rIL1 (50 U/ml; lane 5) or anti-IFN γ (1/800 serum dilution; lane 7).

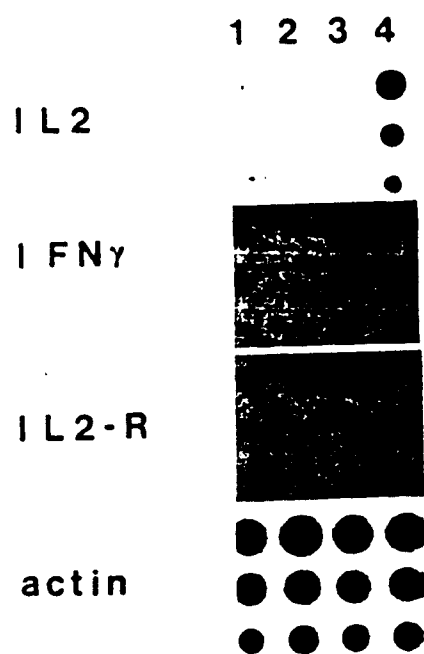


Figure 2 : IL2, IFN γ , IL2-R p55 and β actin RNA induction in mature thymocytes stimulated with plate-bound CD3 mAb in the presence or absence of IL1.

RNA dot blot analysis of mature thymocytes stimulated with medium alone (1), IL1 (50 U/ml, 2), plate-bound CD3 mAb (3) and plate-bound CD3 mAb plus IL1 (4). The IL2 autoradiogram was of the 6 hr time point. The IFN γ , IL2-R and β actin autoradiograms are of the 18 hr time point. Probes were tested on thymocytes RNA northern blot and each gives a specific signal with no cross hybridization.

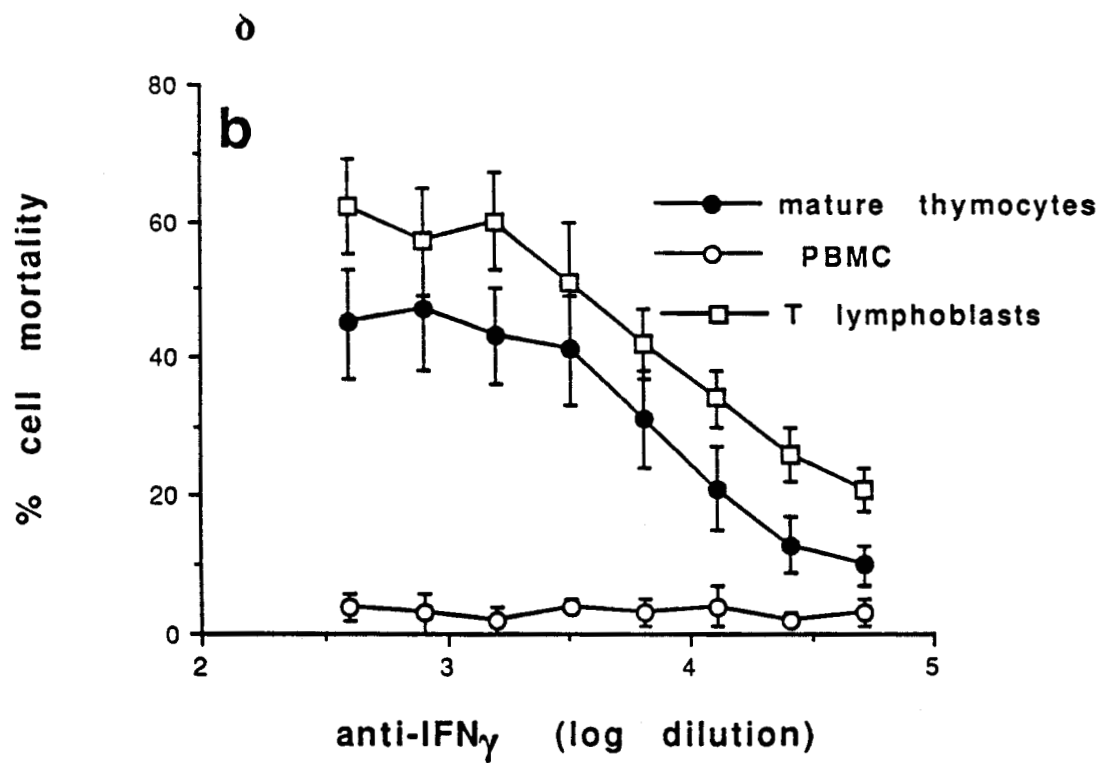
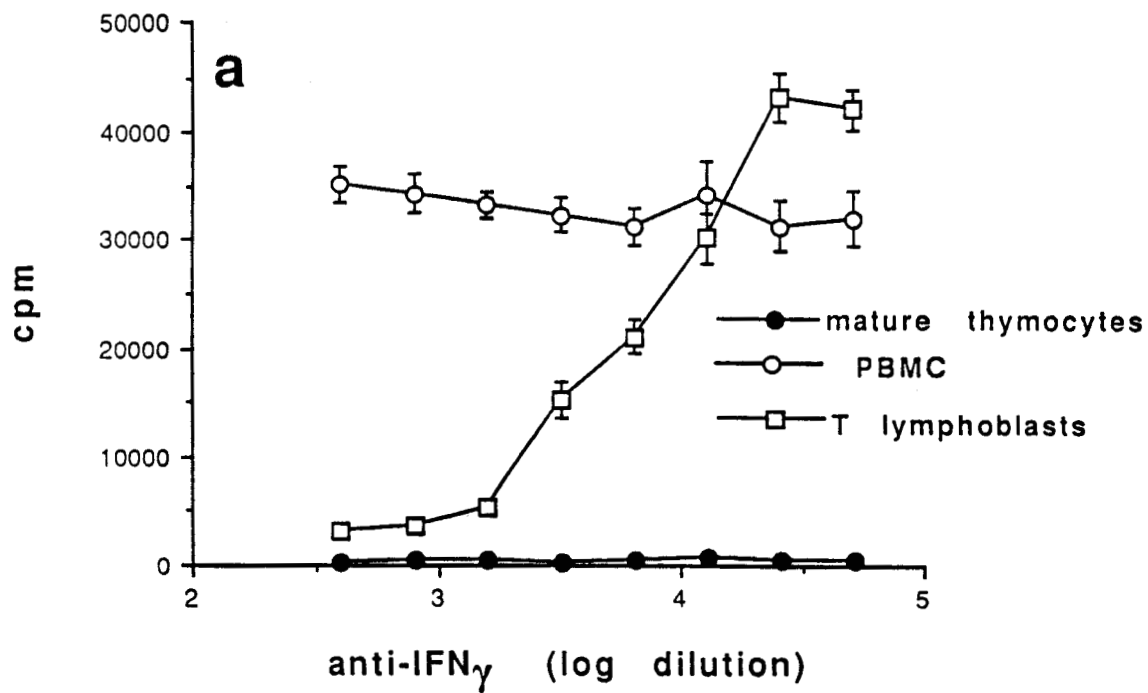


Figure 3 : Action of anti-IFN γ on proliferative response and cell death of different cell type activated by plate-bound CD3 mAb.

a) Peripheral blood T cells (PBMC) or mature thymocytes were activated by plate-bound CD3 mAb and the proliferative response was tested after 3 days in the presence of increasing amounts of anti-IFN γ . PHA lymphoblasts were stimulated by rIL2 (10 U/ml) and plate-bound CD3 mAb and the proliferative response was tested after 2 days in the presence of increasing amounts of anti-IFN γ . Results shown are mean \pm SD of triplicate culture of 1 out of 3 representative experiments.

b) Mature thymocytes, PHA lymphoblast and PBMC were stimulated with plate-bound CD3 mAb in the presence of rIL2 (10U/ml) for the cell lines and increasing amounts of anti-IFN γ . Cell death was monitored at 24 hr for cell lines and 48 hr for mature thymocytes and PBMC. Results shown are mean of duplicate \pm S.D. of percent cell death of one representative experiment out of 3.

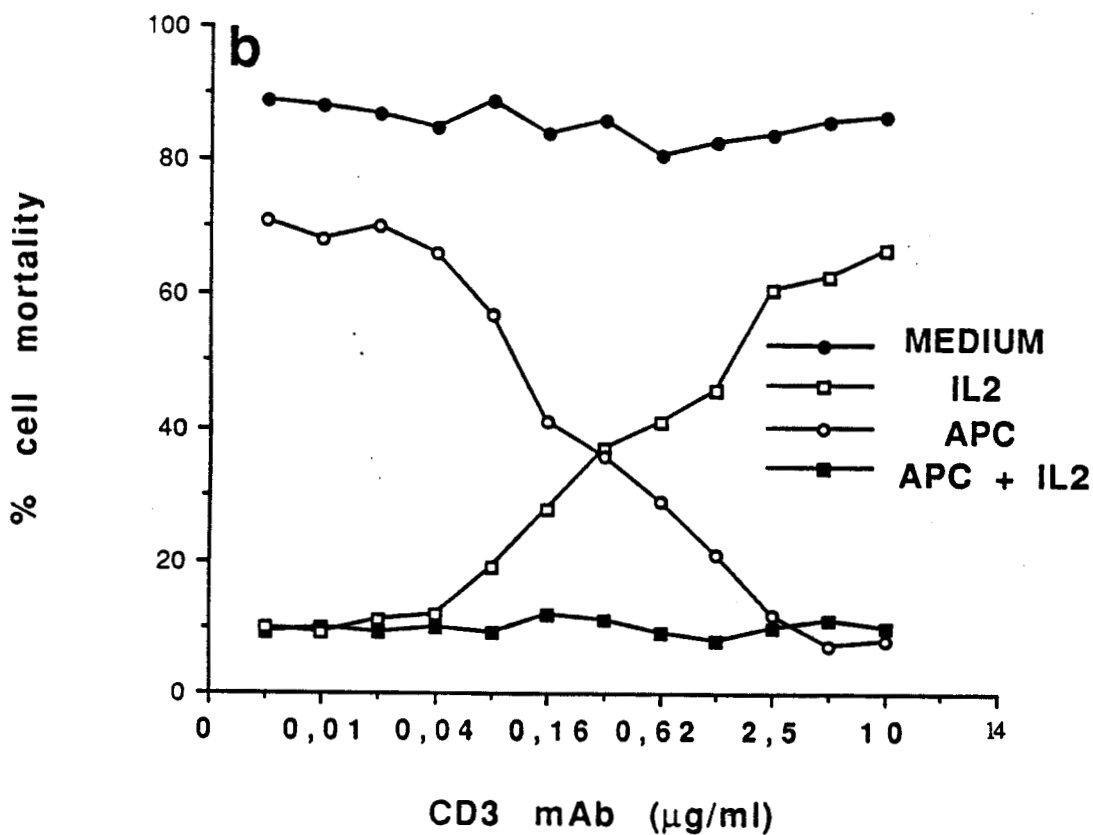
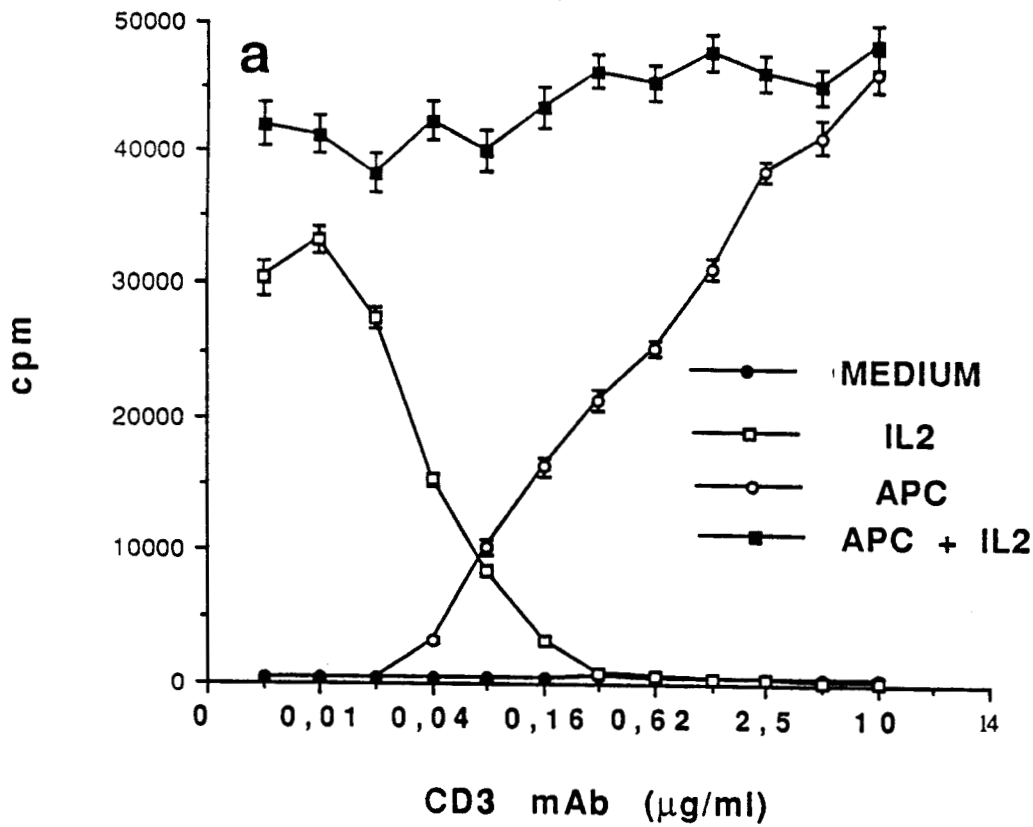


Figure 4 : Inhibition of IL2 response in PHA lymphoblasts by various amounts of plate-bound CD3 mAb and rescue of proliferation by accessory cells.

a) PHA lymphoblasts were stimulated with various amounts of fixed CD3 mAb in the presence or absence of rIL2 (10 U/ml) or autologous adherent cells (APC, $5 \cdot 10^4$ cells/well) as indicated. Results represent mean of triplicate \pm S.D. for a 48 hr assay of one representative experiment out of 4.

b) PHA lymphoblast were stimulated as described in figure 2a and cell death was determined 24 hr after stimulation by trypan blue exclusion. Results shown are percentage of cell death of one representative experiment out of 3.

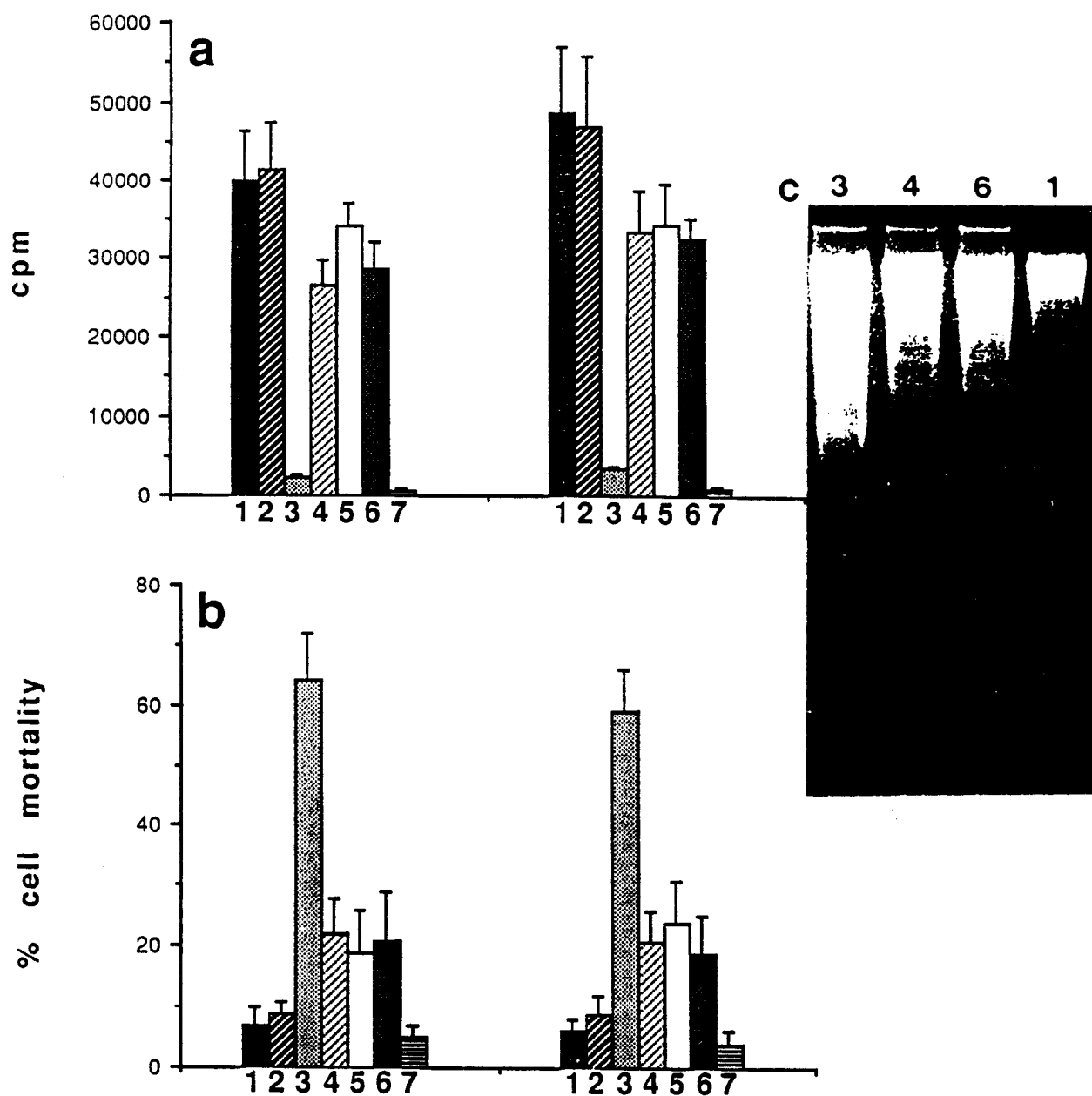


Figure 5 : Proliferative response and induction of cell death in different cell types by plate-bound CD3 mAb.

Tetanus toxoid dependant cell line (A) or PHA lymphoblasts (B) were maintained in medium supplemented with rIL2 (10 U/ml) and stimulated with plate-bound CD5 mAb as control (A2, B2) or plate-bound CD3 mAb (A3-7, B3-7) in the presence of rIL1 (50 U/ml; A4, B4), rIL2 (200 U/ml; A5, B5), anti-IFN γ (1/800 dilution serum; A6,B6) or cycloheximide (A7, B7).

a) Cell proliferation was determined by $^3\text{[H]}$ -TdR incorporation. Thymidine was added the last 8 hr of day 2. Results represent mean of triplicate culture \pm SD of one representative experiment out of 5.

b) Cells were prepared and stimulated as described in figure 3a. Cell death of antigen dependant cell line (A) and PHA lymphoblasts (B) was measured at 24 hr and results shown are percentage of cell death of one representative experiment out of 4.

c) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from PHA lymphoblasts. Lymphoblast were cultivated in presence of rIL2 (10 U/ml) and activated with plate-bound CD3 mAb (lane 3,4,6) with rIL1 (50 U/ml; lane 4) or with anti-IFN γ (1/800 serum dilution; lane 6).

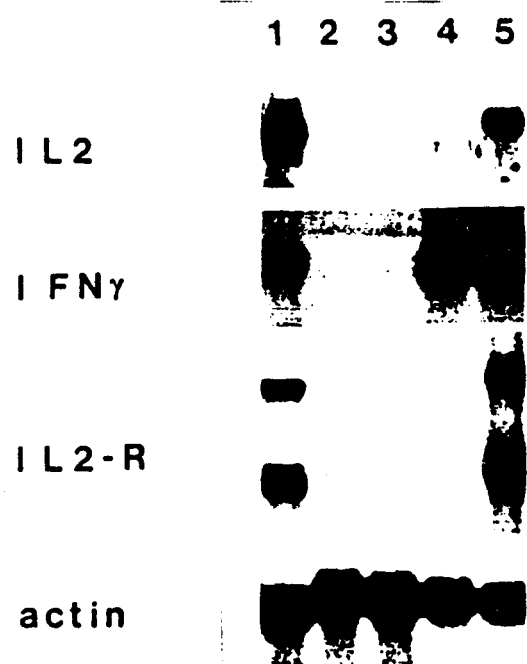


Figure 6 : Northern blot analysis of T lymphoblasts stimulated with medium alone (2), IL1 (50 U/ml)(3), plate-bound CD3 mAb (4) and plate-bound CD3 mAb plus IL1 (5). PBMC stimulated with PHA (5 μ g/ml) were used as control in lane 1. The IL2 autoradiogram was of the 6 hr time point. The IFN γ , IL2-R and β actin autoradiograms are of the 18 hr time point.

TABLE 1

Proliferation, cell death and secretion of IL2 and IFN γ in mature thymocytes activated with CD3 mAb.

stimuli	proliferation (cpm)	% mortality	IL2 (pg/ml)	IFN γ (pg/ml)
medium	385 \pm 47	5	<1	<1
CD3 mAb	298 \pm 58	48	<1	3215
CD3 mAb+IL1 α	37318 \pm 4217	16	770	3817
CD3 mAb+CsA	317 \pm 48	9	<1	<1
CD3 mAb+CsA+IL2	21817 \pm 886	8	ND	<1
CD3 mAb+CsA+IFN γ	417 \pm 134	39	<1	ND
CD3 mAb+CsA+IL2+IFN γ	17452 \pm 2657	15	ND	ND

Mature thymocytes were purified and cultured as described in Fig 1 with indicated stimuli : CsA (200 ng/ml), IL1 (10 U/ml), IFN γ (100 U/ml) or IL2 (10 U/ml). Cell proliferation was determined by 3 [H]-TdR incorporation, thymidine was added in the last 12 hr of day 3 and results are express as mean of triplicate culture \pm SD. Cell mortality was detected by trypan blue exclusion and was tested 48 hr after activation. Lymphokine secretion was tested in supernatant collected at 48 hr by an ELISA kit. Results are mean of duplicate of one representative experiment out of 3 for each cell type.

TABLE 2

Induction of cell death by IFN γ in activated T cells in the presence of cyclosporine A

cell type	stimuli	proliferation cpm	%mortality	IL2 pg/ml	IFN γ pg/ml
PBMC	medium	317 \pm 38	3	<1	<1
	CD3 mAb	34879 \pm 2587	4	1267	3874
	CD3 mAb+IL1 α	42587 \pm 3562	3	1314	3256
	CD3 mAb+CsA	354 \pm 89	4	<1	<1
	CD3 mAb+CsA+IL2	28745 \pm 3478	3	ND	<1
	CD3 mAb+CsA+IFN γ	356 \pm 58	68	<1	ND
	CD3 mAb+CsA+IL2+IFN γ	31478 \pm 2698	5	ND	ND
T lymphoblasts	medium	8752 \pm 543	9	73	42
	CD3 mAb	6470 \pm 360	71	52	3541
	CD3 mAb+IL1 α	40521 \pm 2032	18	1754	4128
	CD3 mAb+CsA	9521 \pm 870	11	31	<1
	CD3 mAb+CsA+IL2	49102 \pm 3827	10	ND	<1
	CD3 mAb+CsA+IFN γ	981 \pm 81	83	<1	ND
	CD3 mAb+CsA+IL2+IFN γ	31478 \pm 1587	13	ND	ND

Cells were cultured with plate-bound CD3 mAb with CsA (200 ng/ml) and IFN γ (100 U/ml) or IL2 (10 U/ml) or with IL1 (50 U/ml). Cell proliferation was determined by thymidine incorporation which was added in the last 12 hr of 3 days for PBMC or in the last 8 hr of 48 hr for T lymphoblasts. Results are mean \pm SD of triplicate culture of 1 representative experiment out of 2 for each cell type. Cell mortality was determined by trypan blue exclusion at 48 hr for PBMC and 18 hr for T lymphoblasts. IFN γ and IL2 were quantified by an ELISA kit in cell culture supernatants collected at 48 hr for PBMC or at 24 hr for T lymphoblasts. Results are mean of duplicate of one representative experiment out of 2 for each cell type.

**LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE :
MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES**

G] Le virus de l'immunodéficience humaine : mécanismes physiopathologiques

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (234-236), est capable d'infecter et d'inhiber les cellules du système immunitaire. L'infection par le VIH induit une diminution des défenses immunes qui se manifeste cliniquement par l'apparition d'infections opportunistes et le développement de maladies cancéreuses inhabituelles comme le sarcome de Kaposi. La déficience immune, progressive et irréversible se termine invariablement par la mort de l'individu.

Depuis les premières descriptions en 1981, aux Etats-Unis, le SIDA est devenue une maladie très répandue avec 69 000 cas déclarés aux U.S.A. et plus de 10 millions de personnes infectés dans le monde. Comme 20 à 30 % des personnes infectés développent une maladie dans les 5 années qui suivent, les projections épidémiologiques pour les années qui viennent sont alarmantes. Cette maladie qui touche aussi bien les pays occidentaux que les pays sous-développés, représente un problème de santé au niveau planétaire et est considérée actuellement par l'OMS et beaucoup de gouvernements comme une priorité.

Le virus se transmet par contacts sexuels, par le sang ou ses dérivés et à la période périnatale de la mère à l'enfant à travers le placenta ou par le lait. Le virus possède un tropisme pour les cellules du système immunitaire et certaines cellules du système nerveux et entraîne une immunodépression et des anomalies neuropsychiatriques.

Aus Etats-Unis et en Europe, la transmission a longtemps était limitée aux groupes à risques que sont les homosexuels, les toxicomanes intraveineux, les hémophiles, les polytransfusés (avant 1986 et le contrôle des produits sanguins) ainsi qu'à leurs partenaires sexuels et les enfants nés de mères infectées. Sur le continent africain la transmission semble se faire essentiellement par voie hétéroséxuelle avec une forte proportion de femmes infectées et donc un risque plus important de transmission périnatale.

L'infection est caractérisée par une latence clinique qui évolue progressivement mais de façon variable dans le temps jusqu'au stade SIDA. Le CDC (Center for Disease Control) d'Atlanta a proposé une classification clinico-biologique comprenant 4 stades qui a été adopté par l'ensemble de la communauté scientifique :

-Stade I : Stade de primoinfection précédant la séroconversion (apparition d'une réponse AC spécifique détectable). Parfois la détection d'une antigénémie virale circulante (p24 sérique) permet d'authentifier ce stade. L'existence d'un syndrome viral type mononucléose infectieuse semble précéder ou suivre de peu la séroconversion. Il peut exister aussi des manifestations nerveuses.

-Stade II : Séropositivité sans manifestations cliniques

-II_A : sans anomalies biologiques

-II_B : avec anomalies biologiques (anémie, leucopénie, lymphopénie globale ou sélective CD4⁺, hypergammaglobulinémie polyclonale)

-Stade III : Syndrome lymphadénopathique chronique

-III_A : sans anomalies biologiques

-III_B : avec anomalies biologiques

-Stade IV : Divisé en 5 sous-groupe ne s'excluant pas mutuellement :

-IV_A : manifestations générales (hyperthermie inexplicée, amaigrissement inexplicé, diarrhées, sueurs nocturnes).

-IV_B : manifestations neurologiques à type de démence, détérioration intellectuelle, myélopathies, neuropathies périphériques, etc...

-IV_C : infections opportunistes

-C1 : au moins une des 12 affections reconnues comme opportunistes et définissant l'état de SIDA : pneumopathie à *Pneumocystis carinii*, cryptosporidiose chronique, toxoplasmose, isosporose, anguillulose extra-intestinale, candidose, cryptococcose, histoplasmose, infections à mycobactéries atypiques, infection par le CMV, herpès cutanéomuqueux ou disséminé, leucoencéphalopathie multifocale progressive.

-C2 : au moins une des six autres infections suivantes : leucoplasie chevelue de la bouche, zona, septicémie récidivante à salmonelle, nocardiose, tuberculose, candidose buccale.

-IV_D : cancers secondaires incluant : sarcomes de Kaposi, lymphomes non hodgkiniens, lymphome cérébral primitif.

-IV_E : manifestations inclassables dont la pneumonie lymphocytaire interstitielle, le purpura thrombopénique.

•1. Le virus

Pour mieux comprendre les mécanismes pathogènes de l'immunodéficience humaine, il faut considérer la nature particulière de l'agent étiologique, le VIH.

•1.1. Nature du VIH

Le VIH est un rétrovirus à ARN qui fut d'abord appelé LAV (lymphadénopathy-associated virus) lors de son isolement en 1983 par F. Barre-Sinoussi à l'Institut Pasteur de Paris (234) puis HTLV-III (human T lymphotropic virus) par l'équipe de R. Gallo (235) et ARV (AIDS associated retrovirus) par J. Levy (236). Ensuite, en 1986, un comité international a désigné les différents isolats sous le nom générique de HIV.

La famille des rétrovirus est divisée actuellement en trois sous-groupes selon des critères de pathogénicité (237):

-les oncovirus à ARN : ces rétrovirus très répandue dans le monde animal provoquent des tumeurs et des leucémies. Les HTLV (human T leukemia virus) appartiennent à ce groupe. HTLV I est responsable de leucémies T et de lymphomes cutanés, HTLV II a été isolé chez un patient présentant une leucémie à tricholeucocytes. Chez l'animal, des virus très proches ont été identifiés dont le STLV (simian T cell leukemia virus), le BLV (bovine leukemia virus) et le FeLV (feline leukemia virus).

-les lentivirus : Le VIH fait partie de ce groupe. Ils provoquent des maladies à évolution lente (pneumonies, désordres neurologiques). Parmi ces virus on connaissait depuis longtemps le virus Visna du mouton et le virus de l'anémie infectieuse équine. Récemment d'autres virus de cette famille ont été isolés, notamment le FIV (virus de l'immunodéficience féline) et le SIV (Simian immunodeficiency virus). Ce dernier cause une maladie similaire au SIDA humain chez les macaques en captivité mais ne semble pas être pathogène chez son hôte habituel, le singe vert d'Afrique. Le VIH est maintenant appelé VIH-1 pour le distinguer d'un deuxième rétrovirus humain (VIH-2) isolé à partir de patients vivant en Afrique présentant un SIDA identique à celui induit par HIV-1. Ce virus présente de nombreuses homologues avec le virus SIV (238).

-les spumavirus : ces virus identifiés chez de nombreux mammifères n'ont pas de pathogénicité connue chez l'homme.

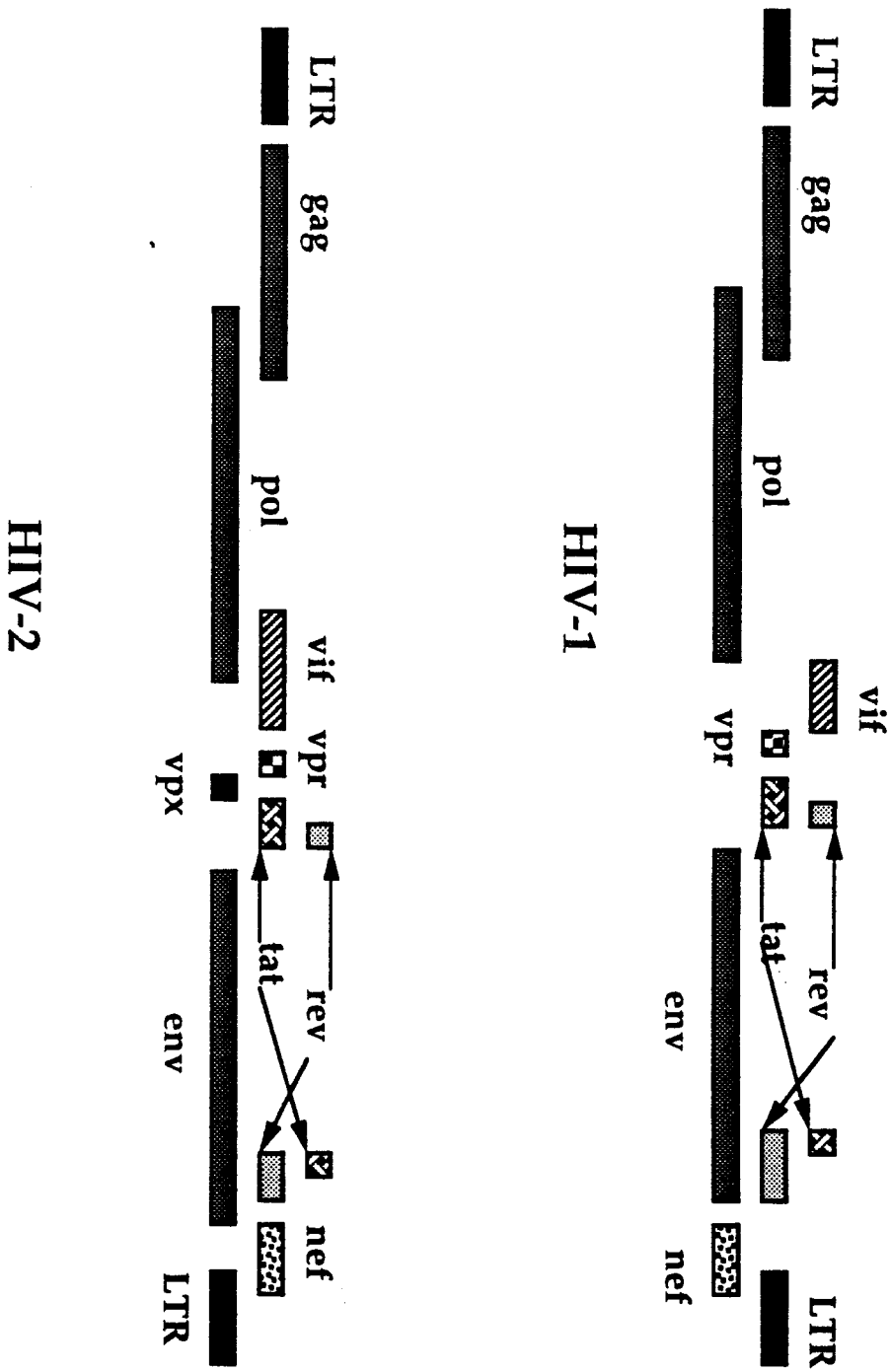


Figure 2 : Organisation génomique du VIH

La caractéristique commune des rétrovirus est leur matériel génétique porté sur un ARN simple brin. Lors de l'infection de la cellule, une transcriptase reverse, codée par le génome du virus et présente dans la particule virale, devra traduire l'ARN en ADN.

• 1.2. Le génome du VIH.

En microscopie électronique, le VIH présente un noyau dense, formés des protéines codées par le gène gag, qui contient deux copies de la molécule d'ARN porteuse du génome viral. Le noyau est entouré d'une enveloppe lipidique provenant de la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement du virus et où sont insérées les molécules de surface gp120 et gp 41. Les molécules nécessaires à la réplication et à l'insertion du virus comme la transcriptase réverse et l'endonucléase sont également présente à l'intérieur de la particule virale (239).

Le génome du VIH est bien connu (cf figure). Il s'agit d'une séquence longue de 10 kb (kilobases) dont les deux extrémités sont formés par les séquences LTR (long terminal repeat) qui servent à la régulation de la transcription virale. Comme tous les rétrovirus, le VIH comporte les 3 gènes gag, pol et env codant respectivement pour :

-gag : la protéine (p55) de la capsid des virions

-pol : la transcriptase reverse (p66/51), l'endonucléase (p31) et la protéase clivant la p55 en p24 et p17.

-env : les glycoprotéines d'enveloppe, gp160 clivée en gp120 et gp41 cette dernière comportant une partie transmembranaire. Ces deux molécules restent assemblées par des liaisons non covalentes.

A coté de ces protéines qui constituent le virion, on a pu montrer que le génome viral, en utilisant les 6 cadres de lecture disponibles, codait pour 5 (VIH-1) ou 6 (VIH-2) molécules régulatrices différentes. Ces molécules exprimées à l'intérieur de la cellule infectées agissent sur la latence de l'infection et sur la régulation de l'assemblage des virions. Par ailleurs, il est possible que ces molécules dont certaines sont capables de moduler l'expression génique, jouent un rôle pathogène au sein de la cellule infectée.

-tat pour transactivator, une molécule de 14 kDa qui joue un rôle important dans la réplication virale en augmentant la transcription ou la traduction virale (240).

-rev pour regulatory of expression of virion, la molécule p13 nécessaire à la transcription des protéines structurales du virion. (240)

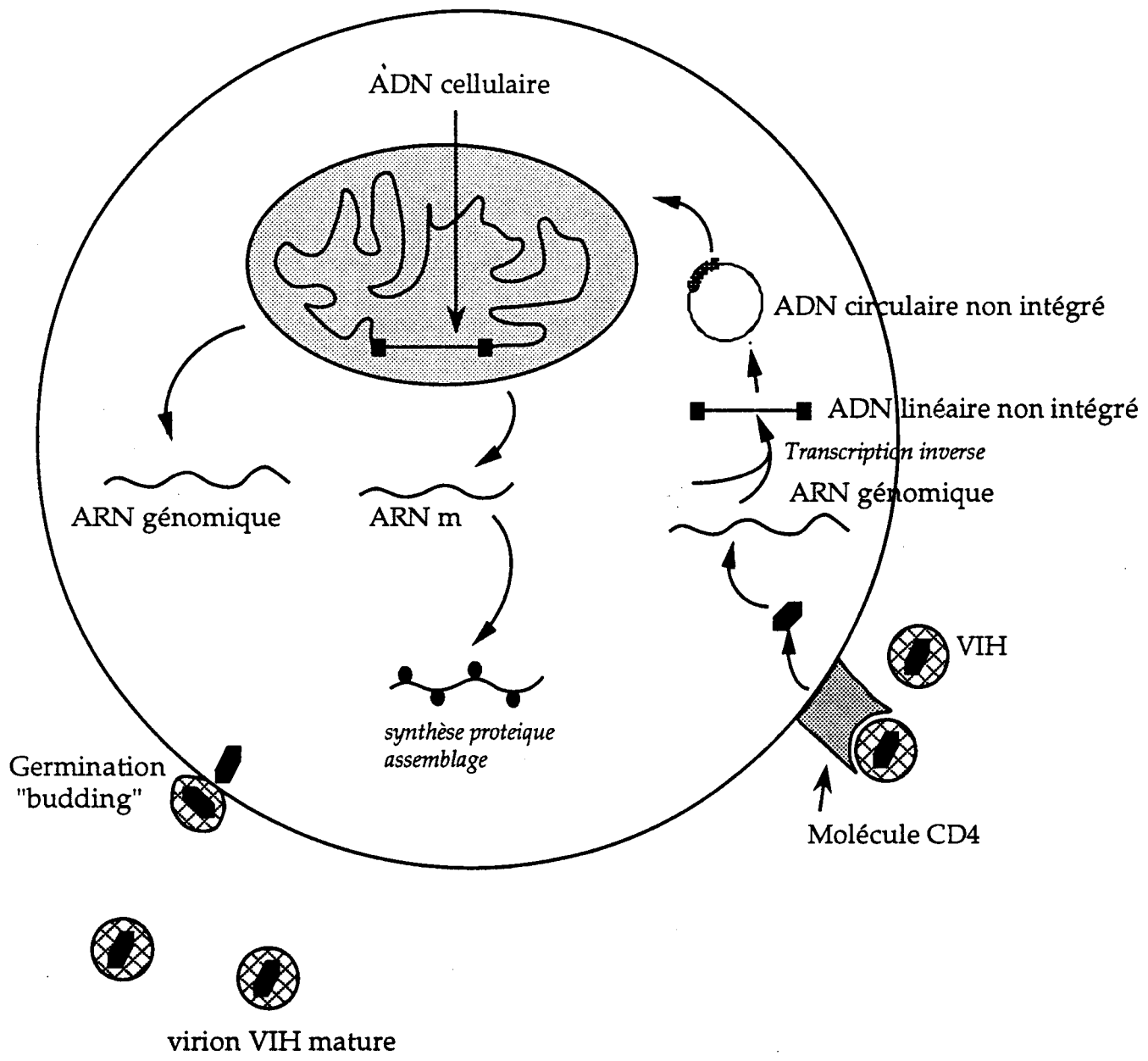


Figure 3 : Le cycle viral

-vif pour virion infectivity factor, cette p24 a un rôle dans l'acquisition du caractère infectieux du virus (assemblage post traductionnel des protéines virales)

-nef pour négative factor (p27) son rôle inhibiteur de la réplication virale est très discuté. (241)

-vpr (R) transactivateur faible ?

-vpx, uniquement présent dans VIH-2 et SIV, son rôle est inconnu.

•2. L'infection par le VIH.

Le VIH présente un tropisme sélectif pour les cellules exprimant la molécule CD4 et de nombreuses évidences laissent à penser que la molécule CD4 est le récepteur du virus (242). La proportion des cellules CD4⁺ est réduite in vivo chez les malades du SIDA, et in vitro cette diminution se produit en même temps que la réplication virale (243). Puis Dalgleish et coll. ont montré que des anticorps CD4 inhibaient l'infection virale (244). En fait, seuls quelques épitopes de la molécule CD4 sont importants, ceux reconnus par les anticorps Leu3a et OKT4a par exemple et servant à la fixation de la molécule gp120 du VIH. La fixation de la molécule gp120 sur la molécule CD4 à la surface de la cellule induit un changement conformationnel du complexe gp120/gp41 libérant une partie hydrophobe de la molécule gp41 qui peut alors se fixer dans la membrane cytoplasmique de la cellule permettant la fusion de la membrane cellulaire et de la membrane virale.

Une fois internalisé, l'ARN génomique est transcrit en ADN par la transcriptase reverse. L'ADN proviral qui peut exister sous une forme linéaire ou circulaire s'intègre dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte grâce à une endonucléase codée par le gène pol. La transcription de l'ARN et l'intégration de l'ADN proviral ne se produit que dans des cellules activées (247). Contrairement à la plupart des autres rétrovirus étudiés, l'infection par le VIH-1 s'accompagne par l'accumulation d'une assez grande quantité d'ADN viral non intégré dans la cellule infectée (246), ce qui est peut-être un facteur important de cytotoxicité (246) car lorsque ce phénomène se produit avec les autres rétrovirus; il est accompagné d'une cytotoxicité accrue (247).

Après l'intégration du provirus, l'infection peut rester dans une phase de latence jusqu'à ce que la cellule infectée soit activée. L'activation de la cellule permet à l'ADN proviral d'être transcrit en ARN génomique viral et en ARN messenger codant pour les protéines de structures. Lorsque

l'assemblage du provirion est terminé, celui-ci bourgeonne à la surface de la cellule en emportant une partie de la membrane cytoplasmique.

Sachant que le VIH avait un tropisme pour la molécule CD4, on a recherché les cellules pouvant exprimer cette molécule à leur surface et donc potentiellement infectable par le virus. Ceci a permis de montrer que les cellules de la lignée monocyto-histiocytaire : les monocytes, les macrophages, les cellules de Langerhans, les cellules folliculaires dendritiques, les cellules de Küpfer et les cellules gliales du système nerveux central, sont des populations infectables par le VIH. De plus le VIH n'ayant pas d'effet cytopathogène dans ces cellules, elles constituent des réservoirs potentiels de virus *in vivo* (248).

Il existe pourtant d'autres cellules qui n'expriment pas ou très peu de molécules CD4 à leur surface mais qui sont infectables par le VIH. On peut citer les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse (249), les lignées B EBV (250)(Montagnier levy), des lignées mégacaryocytaires (251,252)(MONTE D. etc... cf Didier. Les mécanismes conduisant à l'infection de ces cellules ne sont pas bien définies même si on a pu faire appel à l'effet facilitant d'immunoglobulines ou de facteurs du complément.

•3. Les mécanismes immunopathologiques de l'infection par le VIH.

La base de l'immunopathogénie de l'infection par le VIH est la déplétion de la sous-population des cellules T CD4⁺ "helper" qui conduit à une immunodéficience profonde (247). Bien qu'un grand nombre de dysfonctions du système immunitaire aient été décrit dans le SIDA, la plupart peuvent être expliqués par une atteinte de cette sous-population cellulaire. En effet, les cellules CD4⁺ sont les cellules pivots du système immunitaire à l'origine de l'induction de la plupart des fonctions immunologiques. La disfonction de cette sous-population cellulaire peut donc à elle seule expliquer toutes ces déficiences immunes.

•3.1. Les effets cytopathogènes du VIH

In vitro, lors de la réplication virale, la cellule hôte, lorsque c'est un lymphocyte CD4⁺, est souvent tuée. Pourtant les mécanismes précis qui entraînent cette mort cellulaire ne sont pas bien connus. En effet, seules les cellules T subissent cet effet cytopathogène, les cellules monocytaires par

exemple y sont insensibles et peuvent produire du virus sans être tuées. De nombreuses explications ont été apportées pour expliquer ce mécanisme cytopathogène du VIH.

•3.1.1. Rôle direct du virus

Dans les effets cytopathogènes directs du virus, nous avons déjà discuté du rôle éventuel de l'accumulation d'ADN proviral non intégré (247). Un autre mécanisme proposé est la perte de l'intégrité de la membrane plasmique lors de la production d'une grande quantité de virions et de leur bourgeonnement à la surface de la cellule (247). D'autres ont proposé que le développement du virus à l'intérieur de la cellule induise une différenciation terminale de la cellule entraînant sa mort précoce (253), cependant les évidence d'un tel mécanisme sont faible. Plus récemment, Terai et coll. (254) ont montré l'induction d'une mort par apoptose dans des lignées T et des lymphocytes isolés du sang périphérique infectés *in vitro* par le VIH. Dans ce système, le mécanisme d'action du virus n'est également pas encore connu.

Il semble de plus en plus évident pourtant que la présence d'une grande quantité de molécule CD4 à la surface de la cellule joue un rôle dans les effets cytopathogènes du VIH. En effet, les monocytes et les macrophages qui expriment cette molécule CD4 en faible quantité (255) et peuvent être infectés par le VIH, ne subissent pas ses effets cytopathogènes (256). De plus, si des clones T CD4⁺ ou CD8⁺ infectés par le virus HTLV-I peuvent être infectés de manière productive par le VIH-1, seuls les clones CD4⁺ sont tués, les clones CD8⁺ sont résistants aux effets cytopathogènes du VIH (257).

Il existe dans l'infection par le VIH un mécanisme dépendant de l'expression de la molécule CD4 qui pourrait être important dans les mécanismes de cytotoxicité : il s'agit de la formation de syncytia *in vitro*. La formation de syncytia s'effectue entre des cellules infectées et des cellules saines grâce à un pontage effectué par les molécules gp120 virales entre les molécules CD4 de cellules adjacentes (258). S'il n'est pas rare de trouver des cellules géantes dans les ganglions ou le cerveau de patients souffrant de SIDA, ces cellules sont généralement d'origine monocyto-histiocytaire (259,260). Des syncytia T ne sont que très rarement détectés chez les patients montrant que ce mécanisme n'est certainement pas celui permettant d'expliquer la perte des cellules T *in vivo*.

• 3.1.2. Mécanismes indirects

On peut se demander si la disparition des cellules CD4⁺ des organismes infectés par le VIH est due uniquement à des effets cytopathogènes directs ou si d'autres mécanismes indirects peuvent intervenir. En effet, l'utilisation d'anticorps fluorescents dirigés contre des protéines virales (247), et des techniques d'hybridation in situ pour détecter des ARN viraux (261,262) ont montré que seul un faible pourcentage des cellules CD4⁺ in vivo étaient infectées (1/10⁴ à 1/10³). Il est possible qu'un plus grand nombre de cellules soient infectées de façon latente, ces cellules n'expriment pas d'ARN viral et ne sont donc pas détectables par ces techniques. Néanmoins, même si la demi-vie des lymphocytes CD4⁺ n'est pas connue, il semble que l'organisme soit capable de compenser facilement un taux aussi faible de cellules infectées. Donc, les effets cytopathogènes ne peuvent rendre compte de la déplétion lymphocytaire CD4⁺ observée. C'est pourquoi on a recherché des mécanismes indirects de destruction des lymphocytes CD4⁺ sains.

• 3.1.2.1. Infection des cellules souches hématopoïétiques.

Comme nous l'avons déjà vu plus haut, il est possible que les cellules souches hématopoïétiques soient infectées par le virus (247); d'autre part, les thymocytes immatures eux aussi peuvent être infectés (263). L'infection des cellules immatures peut donc être une des causes de la disparition des cellules CD4⁺ en empêchant le renouvellement de ces cellules. Pourtant, l'infection des cellules souches n'est pas spécifique, et par exemple le nombre de cellules CD8⁺ n'est pas diminué au cours de la maladie alors que les cellules souches et les voies de maturation sont similaires pour les deux types cellulaires.

• 3.1.2.2 cytotoxicité dirigée contre les cellules CD4⁺ non infectées.

En 1987, Lyerly et coll. (264) ont montré que la fixation de la molécule gp120 sur son récepteur CD4 à la surface des lymphocytes peut servir de cible pour la destruction de ces lymphocytes. Des anticorps anti-gp120, qui sont retrouvés chez les patients infectés par le VIH, peuvent se fixer sur le complexe CD4-gp120 permettant ainsi la lyse de la cellule par un mécanisme

de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC). Plus tard, l'équipe de E.L. Reinherz (265), en étudiant des clones T humains isolés à partir du répertoire naif d'un individu sain et dirigés contre la molécule gp120, on pu isolé un clone T CD4⁺ capable de lyser les cellules autologues CD4⁺; CMH-II⁺ en présence de la molécule gp120. Ces deux mécanismes indirects peuvent également contribuer à la déplétion des cellules CD4⁺.

•3.2. Dysfonctionnement des cellules CD4⁺.

Même si la déplétion des cellules CD4⁺ est le phénomène le plus patent dans la pathogénie due au VIH, on constate également une dysfonction de ces cellules à un stade précoce de la maladie où le nombre de cellules CD4⁺ n'est pas modifié. Cette dysfonction est très abondamment décrite par de nombreux auteurs différents (266-272), et même si l'ampleur et les mécanismes inducteurs de cette dysfonction restent très discutés, il existe à présent un consensus découplant cette dysfonction en 3 étapes en fonction des capacités prolifératives des PBMC (périphéral blood mononuclear cells) de patients.

-Au tout début de la maladie, et ce dès 3 mois après séroconversion (273), les lymphocytes ne prolifèrent plus en réponse aux antigènes mémoires ni au pokeweed mitogène (PWM) alors que leur réponse aux lectines comme la phytohemmaglutinine (PHA), aux anticorps CD3 ou aux cellules allogéniques sont conservés.

-Dans la deuxième étape qui précède la survenue du stade SIDA de moins d'un an (ces anomalies lymphocytaires pouvant même servir de pronostic), les PBMC perdent leur capacité à répondre aux anticorps CD3 et aux cellules allogéniques.

- Dans la dernière phase, qui correspond au stade SIDA, les cellules ne prolifèrent plus à aucun mitogène.

Evidemment les résultats des différents auteurs ne sont pas aussi bien tranchés, ces variations tiennent certainement aux conditions expérimentales, à l'appréciation du stade de la maladie ainsi que parfois à l'interprétation des résultats. Pour expliquer ces dysfonctions lymphocytaires de nombreux modèles ont été proposé :

- augmentation des cellules T suppressives
- réponse autoimmune
- infection et destruction sélective des cellules mémoires.
- signaux inhibiteurs fournis par les protéines virales.

-hyperactivation des cellules et donc incapacité du système immunitaire à répondre à une stimulation ultérieure

•3.2.1. Augmentation des cellules suppressives.

Dès le début de l'infection on observe une diminution des fonctions "helper" alors que l'on observe une augmentation du nombre des cellules CD8⁺ et un inversement du rapport CD4/CD8. De plus, ces cellules CD8⁺ ont une plus grande capacité suppressive (274). D'autres auteurs ont signalé la présence dans le sérum de patients infectés de certains facteurs suppresseurs (275). Ces résultats suggèrent un déséquilibre entre les cellules helper et suppressives qui pourrait conduire à une suppression active de la réponse immune.

Des études immunohistochimiques sur les cellules des ganglions lymphatiques de patients infectés par le VIH, montrent des modifications dans les pourcentages respectifs des différentes sous-populations avec une augmentation de la population des cellules CD8⁺ suppressives, à la fois dans les zones T et même dans les centres germinatifs où il n'y a normalement presque pas de cellules T (276).

Zolla-Pazner et Sidhu (277) ont proposé un schéma permettant d'expliquer l'intervention de ces cellules suppressives. Chez les patients en début d'infection, les cellules suppressives sont induites pour réguler une réponse immune normale dirigée contre le virus. Comme le virus ne peut pas être éliminé, notamment à cause de l'infection des monocytes, la stimulation des cellules suppressives est continue. D'autre part, les cellules infectées, les protéines virales ou les lymphokines secrétées par les cellules infectées entraînent une activation polyclonale des lymphocytes B. Cette hyperactivation induit une stimulation encore plus importante des cellules suppressives qui tentent de réguler ce système. Au contraire, ces cellules suppressives en trop grand nombre ont un effet néfaste en inhibant l'action des cellules CD4⁺, ce qui conduit aux dysfonctions cellulaires observées. Ce schéma est également retrouvé dans d'autres maladies comme la mononucléose infectieuse due à l'EBV (277).

•3.2.2 réponses autoimmunes

De nombreuses manifestations autoimmunes sont observées chez les patients VIH⁺. On décrit de nombreux auto-anticorps (certains dirigés contre

les lymphocytes T), des complexes immuns dans le sérum, des glomérulonéphrites, des altérations histologiques caractéristiques du thymus et un purpura thrombocytopénique d'origine autoimmune (277-280). Les autoanticorps sont le résultat soit d'une activation polyclonale des lymphocytes B, soit d'une réactivité croisée entre des protéines virales et des molécules de l'hôte. Par exemple Golding (281) a décrit une réactivité croisée entre la protéine gp41 du VIH et les molécule de classe II du CMH. Les auto-anticorps produits sont capables d'inhiber la présentation de l'antigène aux cellules T et contribuent donc aux altérations des fonctions immunitaires.

Les changements histologiques observés dans le thymus de patients ressemblent à ceux décrits dans les thymus de certains modèles murins victimes d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVHR) type parents -dans F1 (GVHPF1). Cette observation a amené Shearer (282) à suggérer une relation entre ces deux pathologies. Dans la GVHR murine classique, on observe d'abord l'activation de cellules T helper dirigées contre les molécules CMH-II étrangères, qui va permettre l'activation de cellules cytotoxiques dirigées elles contre les molécules CMH-I allogéniques. Dans la GVHPF1, si on a une activation des cellules helper, on n'observe pas le développement des cellules cytotoxiques. Ceci conduit à une hyperstimulation des lymphocytes B, la production d'autoanticorps, le développement de glomérulonéphrite et l'activation de cellules suppressives. Ceci entraîne une déficience sélective de la réponse immune avec une absence de réponse aux antigènes mais une réponse aux cellules allogéniques conservée. Une situation retrouvée chez les patients VIH⁺. Selon Shearer, qui rejoint ici le modèle décrit par Zolla-Pazner, l'infection virale stimule les lymphocytes T et les lymphocytes B. Dans une réponse normale, la production de cellules cytotoxiques permet l'élimination du virus. Ici, la persistance de l'infection conduit à une hyperstimulation des cellules et au développement de cellules suppressives, responsables des désordres immuns détectés ultérieurement.

•3.2.3. Infection et destruction sélective des cellules mémoires.

F; Miedema et ses coll. (283-285) ont proposé un schéma dans lequel l'infection et la destruction sélective des cellules CD4⁺mémoires permettrait d'expliquer les dysfonctionnements observés en début de maladie quand la capacité de renouvellement du système immunitaire lui

permet de compenser la perte des cellules mémoires par des cellules naïves. Leur hypothèse repose sur trois observations.

-d'une part, l'infection sélective des cellules CD4⁺ de phénotype mémoire (CD29⁺).

-d'autre part la diminution sélective du nombre de cellules CD4⁺ portant le phénotype mémoire : CD4⁺, CD29⁺.

-enfin l'analogie entre les dysfonctions des PBMC de patients infectés et les propriétés fonctionnelles des cellules de phénotype naïf (cf table)

activité fonctionnelle	Propriétés fonctionnelles des sous-populations T		
	cellules mémoires CD29 ⁺	Cellules naïves CD29 ⁻	Cellules T de patients VIH ⁺
Réponse à			
Antigène	++++	-	-
Alloantigène	++++	++++	++++
PHA	++++	++++	++++
dose sub CD3	+++	+	+
CD2	+++	+	+
Production IFN γ	++++	±	±
activité helper	++++	±	±

Comme on peut le voir cette hypothèse est séduisante . Pourtant, si il est indiscutable que seules les cellules mémoires sont infectées in vivo, et comment pourrait-il en être autrement si l'intégration du virus nécessite l'activation de la cellule (245), activation qui donne à la cellule un phénotype mémoire ?(286). La disparition sélectives des cellules mémoires en début de maladie n'est pas retrouvée par tous les auteurs (287-289). D'autre part, la comparaison des dysfonctions lymphocytaires entre les cellules naïves et les cellules de patients VIH⁺ n'est pas toujours aussi nette. Ainsi, nous avons pu montré que la réponse aux superantigènes des cellules naïves était aussi importante que celle des cellules mémoires alors que cette réponse est très diminué dans les cellules de patients VIH⁺. D'autre part, les travaux de l'équipe de Shearer (290,291) montrent que ces cellules mémoires n'ont pas été détruites car même si elles sont incapables de proliférer en réponse à l'antigène elles peuvent encore sécréter de l'IL2 et

de plus il est possible de restaurer leur prolifération en ajoutant des cellules allogéniques.

•3.2.4. signaux inhibiteurs fournis par les proteines virales.

•3.2.4.1. la proteine gp120

La proteine gp120 du VIH se fixe sur la molécule CD4 humaine qui est le seul récepteur de haute affinité caractérisé pour les VIH-1 et 2. Les proteines gp120 et gp41 sont issues du clivage de la proteine gp160 par une protéase cellulaire lors du bourgeonnement du virus. La gp120 reste associée de façon non covalente à la partie gp41 à la surface de l'enveloppe glycoproteique du virion(292). On peut également détecter la gp120 soluble dans les surnageants de cultures cellulaires infectées par le VIH (293).

La molécule CD4 à la surface des cellules T sert à stabiliser l'interaction entre le complexe CD3-TCR et les molécules CMH de classe II présentatrice de l'antigène (294). Une région monomorphique des molécules de classe II du CMH se fixe sur la molécule CD4. Cette interaction active une tyrosine kinase p56^{lck}, associée à la partie intracytoplasmique de la molécule CD4. Cette proteine kinase a la propriété de phosphoryler les chaines ζ du complexe CD3 (69)

L'interaction de la molécule CD4 avec un ligand qui ne mobilise pas le TCR (ce qui est le cas de la gp120) pourrait induire un signal négatif et une diminution de l'expression de la molécule CD4 à la surface de la cellule rendant ainsi la cellule réfractaire aux stimuli ultérieurs (295). D'autre part, un ligand fixé sur la molécule CD4 peut être une gêne stérique à la formation du complexe CD3-TCR-CD4/MHCII-antigène qui permet l'activation de la cellule.

La molécule gp120 purifiée ou le virus inactivé sont capables d'inhiber la réponse mitogénique aux lectines (296), aux antigènes (297) ou aux anticorps CD3 (298) de PBMC normaux. D'autre part les aggregations de la molécule gp120 soit naturelles, soit par l'addition d'anti-gp120 permettent une meilleure efficacité de la molécule (299). La plupart des effets observés avec la molécule gp120 peuvent être obtenus par l'utilisation d'anticorps CD4.

On a pu montrer que l'addition de protéine gp120 sur des lymphocytes T CD4⁺ au repos (300) ou sur des cellules nerveuses (301) était capable d'augmenter la concentration intracellulaire de Ca²⁺ ainsi que le taux d'inositol phosphates permettant dans les cellules T l'expression du récepteur à l'IL2. Ces travaux ont été démenti récemment par l'équipe de J. Bolen (302) qui ne retrouve ni l'augmentation du calcium intracellulaire, ni même une activation de la protéine tyrosine kinase p56^{lck} après la fixation de la molécule gp120 sur la molécule CD4.

Le rôle pathogène de la molécule gp120 tient tout d'abord dans sa capacité à se fixer sur la molécule CD4 ce qui permettra au virus d'infecter la cellule. D'autre part, les expériences *in vitro* montrent que la fixation de la molécule gp120 sur son récepteur inhibe la présentation antigénique et l'interaction nécessaire à l'activation de la cellule entre les molécules CMH-II et CD4. Si les effets immunosuppresseurs de cette molécule sont clairs *in vitro*, les concentrations protéiques utilisées et le type d'inhibition observé ne correspondent absolument pas aux observations obtenus avec les lymphocytes de patients VIH⁺. Par exemple la protéine gp120 est capable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en réponse à la phytohémagglutinine (PHA) (alors que les cellules de patients prolifèrent en réponse à la PHA) et ceci à la concentration de 20 µg/ml (une dose très supérieure à celles utilisées habituellement).

•3.2.4.2 La protéine tat

La protéine tat du VIH active l'expression des gènes du virus et est essentielle lors de la réplication virale *in vitro*. Cette protéine est capable de pénétrer à l'intérieur d'une cellule, d'aller jusqu'au noyau et d'y activer certains gènes (303). Cette propriété de la molécule a amené l'équipe de A.D. Frankel (304) à regarder l'effet de tat sur la prolifération antigénique des lymphocytes T. A 2 µg/ml, la protéine tat est capable d'inhiber jusqu'à 90% la prolifération de lymphocyte T en réponse à des antigènes. En revanche, cette protéine n'a aucun effet sur la prolifération induite par des lectines mitogéniques comme la PHA. Le mécanisme d'action de cette protéine n'est pas connu mais l'équipe de Frankel a noté qu'une forme oxydée de cette protéine (qui perd alors ses propriétés de transactivateur génique) est incapable d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en réponse aux antigènes. Ceci montre que l'action de cette protéine doit passer par l'activation de certains gènes cellulaires.

• **3.2.5. Hyperactivation des cellules et donc incapacité du système immunitaire à répondre à une stimulation ultérieure, transduction des signaux défectueuse.**

Les dysfonctions cellulaires détectées chez les patients VIH⁺ sont à la fois des suppressions et des augmentations de la réponse immune. En effet, si la réponse des cellules T est diminuée, celle des cellules B est fortement augmentée et on note une activation polyclonale accompagnée d'une hypergammaglobulinémie (305). On a donc pensé que le VIH ou ses protéines, pouvaient induire une activation chronique des cellules B mais aussi des cellules T. Ces cellules activées chroniquement sont alors incapables de répondre à une stimulation ultérieure. Ainsi les manifestations de suppression et d'hyperactivation seraient le résultat du même changement cellulaire, certains auteurs ont tenté de définir ce facteur.

En utilisant des lignées T ou des lymphocytes T CD4⁺ infectées *in vitro*, certains auteurs ont pu montrer que ces cellules présentaient des dysfonctions dans leur capacité à transmettre les signaux d'activation. Ainsi sur la lignée H9, Gupta (306) puis Pinching (307) ont montré une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire lors de son infection par le VIH. Ces cellules deviennent alors réfractères à une augmentation subséquente induite par des anticorps CD3 ou la PHA. Ces travaux ont été poursuivis par Linette et coll. (308) qui étudiant des lymphocytes CD4⁺ infectés *in vitro* ont montré une absence de mobilisation du calcium intracellulaire médiée par des anticorps CD3 alors qu'ils observent une augmentation de la concentration intracytoplasmique de Ca²⁺ avec une activation via CD2. De plus Pinching, toujours avec la lignée H9, montre que la concentration en inositol phosphate est également élevée, et qu'il n'est pas possible de l'augmenter par une activation avec de la PHA.

Nous avons vu que l'addition de gp120 sur des lymphocytes non infectés pouvait augmenter la concentration intracytoplasmique de Ca²⁺ et d'inositol phosphate (300). L'interprétation de ces résultats selon Pinching est la suivante : l'association entre les molécules gp120 et CD4 à la surface de la cellule entraîne une augmentation des inositol phosphate et du Ca²⁺ intracellulaire médiée par les effets tyrosine kinase de la p56^{lck} associé à la molécule CD4. D'autre part, on assiste à la dissociation des molécules CD3 et CD4 à la surface de la cellule, ce qui entraîne une dysfonction de la voie

d'activation CD3 qui nécessite la proximité physique de ces deux molécules. Cette séparation peut se faire par une internalisation de la molécule CD4 après fixation de la molécule gp120 par exemple.

•4. l'hypothèse de la mort programmée par activation

•Résumé de l'article 5

Le syndrome de l'immunodéficience acquise est causé par une disparition progressive et sélective des cellules T CD4+, cibles de l'infection par VIH. Cependant, la plupart des auteurs s'entendent pour reconnaître que la première dysfonction immunitaire détectée, et ceci plusieurs années avant la diminution du nombre absolu des cellules T CD4+ est l'incapacité sélective de ces cellules à répondre aux antigènes mémoires et au Pokeweed mitogen (267,268,290). Par contre, les cellules T CD4+ conservent beaucoup plus longtemps la possibilité de répondre *in vitro* à des cellules allogéniques, à la PHA et à des anticorps CD3. Si ce constat est bien admis, la cause de cette dysfonction est inconnue.

Elle ne semble pas liée à un effet lytique du virus dans la mesure où ces anomalies se produisent avant la diminution du nombre des cellules CD4+ et alors que le nombre de cellules infectées est inférieur à 1/1000 (361,262).

Ceci a orienté les recherches vers un mécanisme indirect.

- l'action des cellules suppressives(309,274).
- l'influence des cellules présentant l'antigène
- le rôle inhibiteur de certaines protéines virales
- des mécanismes d'autoimmunité (281)

Malheureusement, ces différentes voies de recherche n'ont pas permis d'obtenir un modèle clair permettant d'expliquer l'ensemble des anomalies détectées *in vivo*.

Nous avons développé une hypothèse permettant d'expliquer à la fois la dysfonction précoce et la déplétion tardive des cellules T CD4+ des patients infectés par VIH-1 par un mécanisme unique : la mort cellulaire induite par activation ou mort cellulaire programmée ou apoptose (310).

Nous avons testé *in vitro* la prolifération des cellules T de patients asymptomatiques, ou de sujet normaux, en réponse à différents stimuli mitogéniques. Nous avons pu observer que les cellules T de patients VIH+ présentaient un déficit sélectif de réponse au PWM, aux antigènes mémoires ou à la mobilisation du récepteur T, dépendante des molécules de

classe II du CMH, et conduite par les "superantigènes" comme l'enterotoxine staphylococcique B (SEB). Ce déficit de prolifération est corrélé à l'induction d'une mort cellulaire des lymphocytes T CD4+ avec les caractéristiques de l'apoptose (nécessité d'une synthèse protéique, fragmentation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases et condensation de la chromatine). Comme pour les thymocytes, la cycloheximide et la cyclosporine A inhibent cette mort cellulaire induite par activation. Mais contrairement à ce qui est observé pour les thymocytes, ni les esters de phorbol, ni l'IL1, ni l'IL2 ni les anti-IFN γ ne sont capables d'inhiber l'apoptose des lymphocytes de patients VIH+. Seuls parmi les seconds signaux testés, les anticorps dirigés contre la molécule CD28 sont capables d'inhiber l'apoptose tout en restaurant la prolifération des lymphocytes T CD4+ de patients en réponse au PWM, aux "superantigènes" mais aussi aux antigènes mémoires (311).

Ces résultats suggèrent donc que les lymphocytes T CD4+ de patients asymptomatiques infectés par VIH-1 sont éduqués *in vivo* pour répondre à une activation sélective en se suicidant par apoptose. Des résultats semblables ont été récemment communiqués par l'équipe de L. Montagnier qui décrit une mort cellulaire par apoptose des lymphocytes de patients infectés par VIH-1, induite par la Ionomycine(312).

Ces résultats permettent d'expliquer les dysfonctions sélectives des lymphocytes T de patients VIH+ détectées *in vitro*. Quant à la délétion *in vivo* des cellules T CD4+ elle pourrait être expliquée par le même phénomène lors de la rencontre entre une cellule T et son antigène qui entrainerait la disparition de celle-là. Cette perte des cellules au cours de la longue période prépatente de la maladie (5-10 ans) permettrait à elle seule d'expliquer la diminution importante et progressive du nombre de lymphocytes T CD4+. D'autre part, les infections de type staphylococciques ou mycoplasmaïques, en inondant l'organisme de toxines de type "superantigène" entraineraient des pertes beaucoup plus importantes en activant non spécifiquement les cellules T.

Par ailleurs, il existe deux phénomènes apparemment paradoxaux chez les sujets infectés par VIH. Le premier est l'activation importante et durable des lymphocytes B et des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques en l'absence de prolifération des lymphocytes helpers T CD4+. L'hypothèse de la mort cellulaire par activation est compatible avec cette observation car l'apoptose est associée à la synthèse précoce de lymphokines (313,314) qui pourraient exercer leur pouvoir d'activation sur les cellules B et sur les cellules T CD8+

cytotoxiques. Le deuxième est le pourcentage très faible ($<1/1000$) de lymphocytes T CD4+ infectés in vivo avant la phase terminale de la maladie. L'intégration du VIH nécessitant l'activation des cellules T CD4+, un processus de suicide rapide après activation expliquerait la coexistence d'un taux d'infection très faible et d'une déplétion progressive de cette population cellulaire.

**Activation-Induced Death by Apoptosis in CD4⁺ T Cells
from HIV-Infected Asymptomatic Individuals**

By Hervé Groux*, Gérard Torpier*, Didier Monté*, Yves Mouton‡, André
Capron* and Jean Claude Ameisen*

*From *Unité INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille, France; and ‡Service des
Maladies infectieuses, Hôpital de Tourcoing, France.*

Running foot: CD4⁺ T-Cell Apoptosis in HIV-infected individuals

Address correspondence to Jean Claude Ameisen,

Unité mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Pr. Calmette
59019 Lille, France. Tel: 20 87 79 62; Fax: 20 87 78 88

Part of this work has been presented to the VII International Conference on
AIDS, Florence, Italy, 16-21 June 1991, (Abs:WA1235); and in a preliminary
report to the French Science Academy (Comptes Rendus de l'Académie des
Sciences, Paris, 1991, 312: 599).

Summary

In immature thymocytes, T-cell receptor (TCR) mobilization leads to an active T-cell suicide process, apoptosis, involved in the selection of the T-cell repertoire. We have proposed that inappropriate induction of such a cell death program in the mature CD4⁺ T-cell population could account for both early qualitative and late quantitative CD4⁺ T lymphocyte defects of HIV-infected individuals. Here, we report that the selective failure of CD4⁺ T cells from 59 clinically asymptomatic HIV-infected individuals to proliferate *in vitro* to TCR mobilization by major histocompatibility complex class II (MHC-II)-dependent superantigens and to pokeweed mitogen (PWM) is due to an active CD4⁺ T-cell death process, with biochemical and ultrastructural features of apoptosis. Activation-induced cell death occurred only in the CD4⁺ T-cell population from HIV-infected asymptomatic individuals and was not observed in T cells from any of 58 HIV-seronegative controls, including 9 patients with other acute or chronic infectious diseases. Activation-induced CD4⁺ T-cell death was prevented by cycloheximide, cyclosporin A, and a CD28 mAb. The CD28 mAb not only prevented apoptosis but also restored T-cell proliferation to stimuli, including PWM, superantigens, and the tetanus and influenza recall antigens. These findings may have implications for the understanding of the pathogenesis of AIDS and for the design of specific therapeutic strategies.

HIV-infected individuals present early CD4⁺ T-cell functional defects (1-7) that precede the quantitative reduction in this cell population that leads to AIDS. These functional defects are detected while less than 1/1,000 TH cells are infected (8-10), and are characterized by a selective loss of ability to proliferate *in vitro* to self MHC-II-restricted recall antigens and to PWM (1-7), while the capacity to proliferate to the phytohemagglutinin (PHA) mitogen is maintained. CD4⁺ T-cell dysfunction and depletion have been attributed to a wide range of distinct mechanisms. In particular, the early qualitative defects have been related to T-cell suppression (7,11), clonal anergia (7), autoimmune responses (12), inhibitory effects of HIV proteins (13,14), or selective HIV-mediated destruction of memory T cells, leading to the presence of only naive CD4⁺ T cells (15,16). We have proposed the hypothesis (17) that a single mechanism, the inappropriate re-emergence of a T-cell death program in response to activation could account for both early qualitative and late quantitative CD4⁺ T-cell defects from HIV-infected individuals.

Programmed cell death, or activation-induced cell death, or apoptosis, is an active cell suicide mechanism of widespread biological importance (18) that constitutes the physiological response of normal immature thymocytes to activation (18-23); this process is involved in the negative selection of the T-cell repertoire, the deletion of autoreactive T-cell clones, and the establishment of self-tolerance (24). This cell suicide

mechanism occurs in the absence of bystander-cell destruction, requires cell activation, initiation of protein synthesis, and involves the activation of an endogenous endonuclease that results in a characteristic regular fragmentation of the entire cellular DNA into multiples of an oligonucleosome unit of 200 base pairs (18-28). In immature thymocytes, apoptosis is not an obligatory response to TCR stimulation, but is the consequence of incomplete signal transduction related to the nature of the antigen presenting cell and to the absence of certain co-signals (22,23,29,30). A major question in T-cell biology is thus whether TCR mobilization may also lead in certain circumstances to the re-emergence of a functional cell death program in mature T cells.

We have investigated whether *in vitro* activation of T cells from clinically asymptomatic HIV1-infected individuals - including individuals with normal CD4⁺ T-cell counts - and from controls with polyclonal activators and self-MHC-II-dependent recall antigens may lead to T-cell death. Since memory T cells specific for a given recall antigens are rare, and might be depleted in HIV-infected individuals, we also investigated the T-cell response to the self-MHC-II-dependent staphylococcal enterotoxin B superantigens (SEB) (31). These superantigens bind to MHC-II molecules and interact with defined V β TCR molecules expressed by up to 30% of normal human T cells, inducing proliferation in normal mature CD4⁺ T cells (31) and apoptosis in immature thymocytes (21).

Material and Methods

Study subjects. Peripheral blood was obtained from 109 HIV-infected asymptomatic individuals in the Service des Maladies Infectieuses, Centre Hospitalier de Tourcoing, France. They were 75 men and 34 women, all clinically asymptomatic (stage II of the Center for Disease Control (CDC), Atlanta, classification); 79 were CDC stage IIA (no biological abnormalities, $CD4 > 500/mm^3$, mean 884); 30 were CDC stage IIB (biological abnormalities, $CD4 < 500/mm^3$, mean 342). HIV infection was related to homosexuality (n=49), heterosexual contact (n=30), intravenous drug use (n=28), or blood transfusion (n=2). Controls (n=58) were 49 HIV-seronegative healthy donors and 9 HIV-seronegative patients with infectious or autoimmune diseases. These included respectively: symptomatic infectious mononucleosis; genital herpes; candida albicans spondylitis; cutaneous staphylococcal infection with staphylococcal septic arthritis in a diabetic patient; evolutive loa loa filariasis; evolutive onchocercosis with eosinophilia; falciparum malaria; gram negative pneumopathy; and peri-arthritis nodosa.

Cell preparations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained on Ficoll-Hypaque, and cells were cultured as previously described (32).

In some experiments, $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells were purified by negative selection with magnetic beads coated by anti mouse IgG (DynaI, Biosys, France). Cells ($50 \cdot 10^6$) were plated to plastic Petri dishes in order to

harvest adherent cells by scraping. Non adherent cells were incubated with 5 μ g/ml of CD20, CD56, MHC-II, CD4 or CD8 mAb in a volume of 5ml in RPMI for 30mn. Subsequently, excess antibody was removed by washing twice in RPMI. The cells were then resuspended in 5ml RPMI with magnetic beads (according to the manufacturer's instructions). This mixture was rotated in the cold for 30mn and the cells were passed through a magnetic field twice to remove the cells that had bound to the magnetic beads. Cells were 98% pure as assessed by cytofluorometry.

In some experiments, PBMC were depleted either in CD4⁺ or CD8⁺ T cells by using the same general method, cytofluorometry analysis revealing less than 2% contaminating cells.

Cell proliferation assays. Cell proliferation assays were performed in 96-well culture plates (Nunc) in a final volume of 200 μ l as previously described (33). PBMC (2.5 10^5 /ml) were cultured in RPMI/10% fetal calf serum. Mitogens (purchased from Sigma, France) were used respectively at the following final concentrations: PHA, 10 μ g/ml; Con A, 10 μ g/ml; PWM, 10 μ g/ml; staphylococcal enterotoxin B superantigens (SEB), 1 μ g/ml; the CD3 mAb was used at 1 μ g/ml. Tetanus toxoid (TT) recall antigen (Biomerieux, France) was used at 10 μ g/ml; and Influenza A hemagglutinin (Infl) recall antigen (Eurobio, France) at 10 μ g/ml. After 3 days for mitogens or 6 days for antigens, cultures were pulsed with 1 μ Ci of ³[H]-thymidine (1Ci/mmol or 25 Ci/mmol, depending on the experiments, Amersham, France) during the final 15h of incubation, and harvested.

Evaluation of cell death by Trypan Blue exclusion. Cells were incubated in 96-well plates with various stimuli in the same conditions as for proliferation assays. They were harvested by pipetting and diluted 1:2 with 0.1% trypan blue in PBS. The live and dead cells were counted in a hemocytometer.

DNA fragmentation assays. DNA fragmentation was determined according to the methods of Wyllie and Morris (28) and Newell et al. (33) with slight modifications. In brief, 10^7 cells were collected by centrifugation at 200g for 10mn, and lysed in 1ml hypotonic lysing buffer (5mM Tris Ph 7.4, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X 100). The lysates were centrifuged at 13,000g for 15mn. Supernatants were deproteinized by extraction once in phenol/chloroform and twice in chloroform/isoamyl alcohol (24:1) and precipitated at -20°C in 50% isopropanol, 130 mM NaCl; after electrophoresis on 2% agarose slab gels, DNA was stained by ethidium bromide.

Electron Microscopy. Cells were fixed in 1% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4 for 2h at $+4^{\circ}\text{C}$. Pellets were post fixed in 1% aqueous osmium tetroxide for 1h, en-block stained in 1% aqueous uranyl acetate for 6h and embedded in araldite. Sections were stained with uranyl acetate and lead citrate before examination with a Philips EM 420 electron microscope.

Monoclonal antibodies and chemicals. The mAb used in this study were CD3 (X35-7, IgG2a), generous gift from Dr. Bourel (France); CD28 (9.3,

IgG2a), generous gift from Oncogen corp.; CD28 (CLB 28/1, IgG1), purchased from Jansen; CD20 (IOB20, IgM), CD56 (IOT56, IgG1), HLA-DR (IOT2a, IgG2b), CD4 (IOT4, IgG2a), CD8 (IOT8, IgG2a), were all purchased from Immunotech, France; CD5 (A50, IgG1), CD44 (P245, IgG2a), generous gifts from Dr. A. Bernard, France.

Cyclosporin A was purchased from Sandoz, France; cycloheximide from Sigma, and azidothymidine (AZT) from Burroughs Wellcome.

Statistical analysis. Statistical significance was assessed by using a Students' t test.

Results

Proliferative response of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls. We investigated the *in vitro* proliferation of T cells from 109 HIV-infected asymptomatic individuals and 59 controls in response to the polyclonal activators PHA, Con A, PWM, CD3 mAb, to the tetanus recall antigen, and to the SEB superantigens. T cells from all healthy controls proliferated to all stimuli, while T cells from HIV-infected asymptomatic individuals showed a selective defect in their response to SEB, to recall antigen and to PWM (Fig. 1A).

Proliferation of T cells from HIV-infected individuals to Con A and to CD3 mAb was only slightly reduced (not shown), as was proliferation to PHA (Fig. 1A). This was consistent with the fact that all HIV-infected

individuals studied were clinically asymptomatic, with few or no biological abnormalities, since defective proliferation to CD3 mAb and to PHA have been reported to be predictive markers of evolution towards AIDS in long term infected individuals or patients (34).

As shown in Fig. 1B, T cells from 9 HIV-seronegative controls with acute or chronic infectious diseases proliferated less well to PHA than T cells from HIV-infected individuals, but better to PWM and to SEB.

Cell death in PBMC and purified T cells from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls. Addition of PWM or SEB to PBMC from 59 different HIV-infected asymptomatic individuals was followed by cell death after 48h of about 40% and 20% respectively, of PBMC, whereas no cell death was observed at 48h in the unstimulated PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals. No cell death was detected in the unstimulated and stimulated PBMC from the 49 HIV-seronegative healthy controls (Fig. 2A) and from the 9 HIV-seronegative controls with acute or chronic infectious diseases (Fig. 2B).

In order to identify the cell population undergoing cell death after activation, PBMC from 12 HIV-infected asymptomatic individuals and 4 healthy controls were depleted either of CD4⁺ T cells or of CD8⁺ T cells. After addition of PWM or SEB, cell death was only observed in the CD8⁺ T-cell depleted PBMC population (containing the CD4⁺ T-cell population) from HIV-infected asymptomatic individuals (Fig. 3A), suggesting that neither CD8⁺ T cells, B cells, natural killer cells nor monocytes underwent

activation-induced cell death in the absence of CD4⁺ T cells. Ninety-eight percent pure CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells were also prepared from PBMC from 2 HIV-infected asymptomatic individual and a control. As shown in Fig. 3B, activation-induced cell death in response to PWM or SEB was only observed in the CD4⁺ T lymphocyte population from the 2 HIV-infected asymptomatic individuals (Fig. 3b). The percentages of cell death induced by PWM stimulation (% PWM-induced death - % background death in medium) were respectively of 45% and 52% in the purified CD4⁺ T-cell populations of the 2 HIV-infected individuals. Since activation-induced cell death was only observed in the CD4⁺ T-cell population, and since the percentages of CD4⁺ T cells present in unpurified PBMC were respectively of 50% and 52%, one would expect around 22% and 27% of cell death in PWM-stimulated unpurified PBMC. These percentages are close to the 27% and 30% actually observed. In superantigen-stimulated unpurified PBMC, expected percentages of cell death were of 9 and 10%, and observed percentages were of 10 and 14%. Thus, slightly more cells died in the stimulated unpurified PBMC than in the purified stimulated CD4⁺ T-cell populations. This suggests either that stimulation of the whole PBMC population led to more CD4⁺ T-cell death, or alternately that, when CD4⁺ T cells are present, certain cells other than CD4⁺ T lymphocytes also undergo activation-induced death.

Mechanism and prevention of T-cell death. Death of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals involved 2 features characteristic of apoptosis (18-21,25-28,35). First, gel electrophoresis of the DNA of

PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals, performed 18h after addition of PWM or SEB, showed a DNA fragmentation pattern in multiples of a 200 base pair oligonucleosome length unit (Fig. 4a). Second, electron microscopy of PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals 18h after the addition of PWM revealed nuclear chromatin condensation (Fig. 4c).

Activation-induced T-cell death was not related to HIV-mediated cytopathogenic effects. Indeed, first, electron microscopy of PWM or SEB activated PBMC did not reveal the presence of HIV viral particles; second, as shown in Table 1, experiments performed in the presence of the reverse transcriptase inhibitor AZT did not modify activation-induced cell death in PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals.

An essential characteristic of apoptosis in various cell populations is its dependence on cell activation, gene transcription, and protein synthesis in the dying cell (25-27; reviewed in 18). Addition of the protein synthesis inhibitor cycloheximide, or of cyclosporin A, both of which prevent activation-induced apoptosis in immature thymocytes (20), prevented activation-induced death by apoptosis of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals in response to PWM and SEB (Fig. 2A, and Fig. 4a, lane 7).

Restoration of the capacity of CD4⁺ T cells to proliferate to stimuli. Protein synthesis inhibitors and cyclosporin A, which prevented apoptosis, also prevented T-cell proliferation in response to stimuli. It has been shown in immature thymocytes that the addition of certain cosignals

such as Interleukin-1 (IL-1), IL-2 and phorbol esters, not only prevent apoptosis, but also allow a proliferative response to stimuli (22,24,29,30). Addition to T cells from HIV-infected asymptomatic individuals of IL-1, IL-2 or phorbol esters neither prevented apoptosis nor allowed proliferation in response to PWM or SEB (not shown). The CD28 mAb cosignal, that enhances in normal mature activated CD4⁺ T cells the stability and transcription of several lymphokines mRNA (36,37), has been reported to allow proliferation of normal immature thymocytes to stimuli (38), and to enhance in T cells from HIV-infected individuals the proliferative response to the CD3 antibody (15). As shown in Fig. 2A, 3B, and 4a (lane 14), addition of CD28 mAb to PBMC or purified CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals prevented PWM- and SEB-induced death by apoptosis and, as shown in Fig. 5, also restored T-cell proliferation in response to PWM and SEB. CD28 mAb alone did not induce proliferation of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals (Fig. 5), and CD28 mAb did not enhance control T-cell proliferation to PWM, SEB or TT. CD28 mAb restored proliferation to PWM and SEB of purified CD4⁺ T cells, but not of purified CD8⁺ T cells from an HIV-infected asymptomatic individual (not shown). Two different CD28 mAb (CLB28/1, IgG1 and 9.3, IgG2a isotype) were used and had the same effect, while control mAbs of the same isotype (CD5, IgG1, and CD44, IgG2a) had no effect.

CD28 mAb not only restored proliferation of T cells from HIV-infected individuals to PWM and SEB, but also to the tetanus recall antigen (Fig. 5),

indicating that tetanus-specific memory T cells were present in the HIV-infected individuals, and suggesting that induction of apoptosis might account for their *in vitro* unresponsiveness to the recall antigen.

Antigen-mediated functional deletion of antigen-specific T cells. Whether antigen may induce selective *in vitro* deletion of specific memory T cells was further investigated. PBMC from 4 HIV-infected asymptomatic individuals and from 2 controls were first incubated for 10 days with the tetanus antigen in the absence of CD28 mAb. At day 10, cell mortality was 12 to 15% in PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls. As shown in Table 2, cells were then layered on Ficoll Hypaque, washed twice and incubated for 3 days with PHA or for 6 days with the tetanus or the influenza recall antigens, in the absence or in the presence of the CD28 mAb. Cells from HIV-infected asymptomatic individuals that had been first treated with tetanus recall antigen retained their capacity to proliferate to the influenza recall antigen in the presence of CD28 mAb, but selectively lost their subsequent capacity to proliferate to tetanus in the presence of CD28 mAb, suggesting that tetanus-specific memory T cells had been selectively deleted during the first incubation with the tetanus antigen. As also shown in Table 2, preincubation of PBMC from controls with the tetanus antigen did not lead to any subsequent functional impairment.

Discussion

Our results show that the selective *in vitro* proliferative defect of CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals to TCR mobilization by self-MHC-II-dependent superantigens and to PWM, is related to the induction by these stimuli of an active CD4⁺ T-cell death process by apoptosis. Cell death was not observed in the absence of stimuli nor in response to stimuli that induced proliferation (PHA and the CD3 mAb). Cell death did not occur in mononuclear cells depleted in CD4⁺ T lymphocytes, and was observed in purified CD4⁺ T-cell populations, suggesting that the presence of CD4⁺ T cells was both necessary and sufficient for the induction of this cell death process. No cell death was detected in stimulated or unstimulated T cells from 49 healthy HIV-seronegative controls nor from 9 HIV-seronegative patients with various acute or chronic infectious diseases. Although CD4⁺ T cells from HIV-infected individuals failed to proliferate to TCR mobilization by the self-MHC-II-dependent tetanus and influenza recall antigens, activation-induced CD4⁺ T-cell death in response to these antigens could not be detected. This is consistent with the fact that memory T cells specific for a given recall antigen are rare and that activation-induced cell death spares bystander cells (18), but could also be related, as previously suggested, to an early *in vivo* depletion of antigen-specific memory T cells (15,16). We observed however that addition of a CD28 mAb co-signal that prevented apoptosis and restored T-cell proliferation in response to PWM and to superantigens, also restored T-cell

proliferation to the tetanus and influenza recall antigens, indicating thus that the specific memory T cells were present in HIV-infected asymptomatic individuals. Preincubation of T cells with the tetanus antigen in the absence of CD28 mAb led to a subsequent selective loss of their capacity to proliferate to this antigen in the presence of the antibody, while the T-cell proliferative response to the influenza antigen in the presence of CD28 was not impaired. This suggested that antigen-specific activation-induced CD4⁺ T-cell death was the mechanism most likely to account for the failure of the memory T cells to proliferate to these recall antigens.

After our work was completed and was submitted for publication, two independent reports (39,40) confirmed the existence of a relationship between HIV1 infection and apoptosis. One study (39) showed that *in vitro* activation of PBMC from HIV-infected individuals with calcium ionophore leads in 24h to death by apoptosis of a significant proportion of cells that were not characterized. Death by apoptosis of PBMC from HIV-infected individuals was also observed in this study after a 3 days' incubation in the absence of any stimuli. It should ben noted that our assays, that showed the absence of cell death in unstimulated PBMC from all 59 HIV-infected asymptomatic individuals tested, were always done after a two days' incubation. However, additional investigation of vital dye exclusion that we performed in PBMC from 18 HIV-infected asymptomatic individuals revealed no cell death after 3 days incubation in the absence of stimuli. We do not know whether this discrepancy may be related to differences in cell culture

conditions, or in the biological or clinical status of HIV-infected individuals tested.

The other report does not concern T cells from HIV-infected individuals but shows that the *in vitro* cytopathogenic effect of some HIV1 strains that follows *in vitro* HIV1 infection of T cell-lines or mononuclear cells, is related to the induction of apoptosis (40). In HIV-infected asymptomatic individuals, however, less than 0.1% of peripheral blood CD4⁺ T cells are infected (8-10). Since we observed that *in vitro* activation with PWM resulted in death of around 40% of the CD4⁺ T cells, the possibility that apoptosis occurred only in HIV-infected CD4⁺ T cells could be excluded. This was confirmed by electron microscopy studies revealing the absence of viral particle production, and by *in vitro* experiments performed in the presence of the reverse transcriptase inhibitor AZT showing that AZT did not affect activation-induced T-cell death.

Recent observations of apoptosis in mature murine CD4⁺ T cells (33,41) suggest at least two indirect mechanisms that may account for the re-emergence in the mature CD4⁺ T-cell population of an activation-induced death program. First, CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals may be primed *in vivo* for apoptosis upon further activation. Pretreatment of mature murine CD4⁺ T cells with CD4 antibody has been shown to prime them for apoptosis upon selective mobilization of their $\alpha\beta$ TCR but not of their CD3 complex (33), a response resembling that of CD4⁺ T cells from HIV-infected individuals. Obvious candidates for such an *in vivo*

priming include the binding to CD4 of secreted HIV-gp120 envelope protein released in serum or lymph (42), gp120-anti-gp120 antibody immune complexes, or anti-CD4 autoantibodies. However, preliminary results obtained in our laboratory suggest that the sole preincubation of normal mature human CD4⁺ T cells with CD4 antibody or gp120, whether cross-linked or not, does not lead to apoptosis upon further stimulation.

A second possibility is that CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals have no intrinsic abnormalities, but that defective antigen presenting cell function accounts for induction of T-cell apoptosis. Whether antigen presenting cell from HIV-infected individuals are unable to provide relevant co-signals required for a proliferative response to PWM, or to MHC-II-dependent TCR mobilization, is currently under investigation. It has been shown that restimulation of a mature murine CD4⁺ T-cell clone by cross-linked CD3 antibodies in the absence of antigen presenting cell results in an active cell death process that involves INF γ , and is prevented by anti-INF γ antibody (41). Our preliminary data, however, indicate that anti-INF γ antibody does not prevent activation-induced death of CD4⁺ T cells from HIV-infected individuals.

A third possible interpretation of our findings, that cannot be completely excluded, is that apoptosis is the consequence of a CD4⁺ T-cell/CD4⁺ T-cell killing process. Induction of apoptosis in their target cells is one of the means by which cytotoxic T lymphocytes (CTL) kill their targets (18,43). Although cytotoxic properties have been mainly ascribed to

a sub-population of CD8⁺ T cells, CD4⁺ CTL clones have been described (43). Since cyclosporin A, which does not prevent CD8⁺ CTL- or CD4⁺ CTL-mediated apoptosis of target cells (43), prevented apoptosis of CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals, we think that an activation-induced CD4⁺ T-cell suicide process, in the absence of any participation of CD4⁺ killer T cells, represents at this stage the simplest explanation for our observations.

Our findings suggest the possibility that activation-induced T-cell death may also occur *in vivo* and account for the progressive depletion of CD4⁺ T cells that leads to AIDS. They imply that the rate of CD4⁺ T-cell depletion might directly depend on the percentage of activated T cells and not on the percentage of HIV-infected T cells. In fact, since CD4⁺ T-cell activation is required for HIV-provirus integration, and since activation will result in a rapid cell deletion process for apoptosis, apoptosis could account for the very low percentage of HIV-infected T cells in HIV-infected individuals.

We have observed that CD28 mAb prevents apoptosis and allows *in vitro* proliferation of memory T cells to recall antigens. Therefore, *in vitro* proliferation assays of CD4⁺ T cells in response to various recall antigens in the presence of CD28 mAb, should allow to assess at any given time the extent of the memory CD4⁺ T-cell repertoire that is remaining *in vivo*. This should allow to test whether CD4⁺ T cells specific for pathogens continuously present in HIV-infected individuals, such as HIV itself, herpes

virus, cytomegalovirus, disappear earlier *in vivo* than CD4⁺ memory T cells specific for pathogens that have been rarely (influenza) or never (tetanus) encountered subsequently to HIV infection. Over the years, it is possible that CD4⁺ T-cell loss may extend beyond the T-cell repertoire specific for antigens encountered by the patient. First, once T-cell clones specific for a given pathogen are depleted, the persistence of the pathogen may progressively lead to the recruitment and deletion of low affinity cross-reactive T-cell clones, that are specific for other antigens. Second, surinfection by pathogens that express superantigens, such as staphylococcus, streptococcus or mycoplasma (44), could induce the deletion of a large number of CD4⁺ T cells expressing the matching V β molecules, independently of their antigen-specificity. Since murine retroviruses have been recently shown to encode superantigens (45), one cannot exclude the possibility that HIV itself might lead, during the course of the disease, to the expression of molecules with similar properties.

Our observation that cyclosporin A and the CD28 mAb prevent activation-induced death of CD4⁺ T cells from HIV-infected asymptomatic individuals, and that CD28 mAb also restores their proliferative response to stimuli, might have implications for the design of specific therapeutic strategies aimed at the prevention of AIDS. Animal models of AIDS-related diseases should allow testing the potential beneficial effect of early *in vivo* correction of CD4⁺ T-cell apoptosis on the further evolution of CD4⁺ T-cell counts, and on the course of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Bernard, D. Bourel, Oncogen Corp., and R. vanLier, for providing mAbs; B. Plouvier for expert technical assistance; J.M. Bourez and F. Ajena for clinical work; M. Houache and C. Sartiaux for flow cytometry analysis; F. Ameisen for helpful discussions. This work was supported by INSERM, CNRS, ANRS, European Community (TS 2005F); and by a FERS fellowship to H.G.

References

1. Lane, H.C., J.M. Depper, W.C. Greene, G. Whalen, T.A. Waldmann, and A.S. Fauci. 1985. Quantitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *New Engl. J. Med.* 313:79
2. Shearer, G.M., D.C. Bernstein, K.S.K. Tung, C.S. Via, R. Redfield, S.Z. Salahuddin, and R.C. Gallo. 1986. A model for the selective loss of MHC self-restricted T-cell immune responses during the development of AIDS. *J. Immunol.* 137: 2514
3. Hofmann, B., K.D. Jakobsen, N. Odum, E. Dickmeiss, P. Platz, L.P. Ryder, C. Pedersen, L. Mathiesen, I. Bygbjerg, V. Faber, and A. Svejgaard. 1989. HIV-induced immunodeficiency. Relatively preserved PHA as opposed to decreased PWM responses may be due to possibly preserved responses via CD2/PHA pathway. *J. Immunol.* 142: 1874
4. Miedema, F., A.J.C. Petit, F.G. Terpestra, J.K.M. Eeftinck Schattenkerk, F. DeWolf, B.J.M. Al, M. Roos, J.M.A. Lange, S.A. Danner, J. Goudsmit, and P.T.A. Schellekens. 1988. Immunological abnormalities in HIV-infected asymptomatic homosexual men. *J. Clin. Invest.*, 82: 1908
5. Clerici, M., N.I. Stocks, R.A. Zajac, R.N. Boswell, D.R. Lucey, C.S. Via, and G.M. Shearer. 1989. Detection of three distinct patterns of helper cell dysfunction in asymptomatic, HIV-seropositive patients: independence of CD4⁺ cell numbers and clinical staging. *J. Clin. Invest.* 84: 1892

6. Clerici, M., N.I. Stocks, R.A. Zajac, R.N. Boswell, D.C. Bernstein, D.L. Mann, G.M. Shearer, and J.A. Berzofsky. 1989. IL-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature*, 339: 383
7. Fauci, A.S. 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 239: 617-622
8. Harper, M., L. Marselle, R. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. Detection of lymphocytes expressing HTLV-III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83: 772
9. Schnittman, S.M., M.C. Psallidopoulos, H.C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C.H. Fox, N.P. Salzman, and A.S. Fauci. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a cell that maintains expression of CD4. *Science* 245: 305
10. Brinchmann, J.E., J. Albert, and F. Vartdal. 1991. Few infected CD4⁺ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic HIV-1 infection. *J. Virol.* 65: 2019
11. Hofmann, B., N. Odum, B.K. Jakobsen, P. Platz, L.P. Ryder, J.O. Nielsen, J. Gerstoft, and A. Svejgaard. 1986. Immunological studies in the acquired immunodeficiency syndrome. *Scand. J. Immunol.* 23: 669
12. Golding, H., G.M. Shearer, K. Hillman, P. Lucas, J. Manischewitz, R.A. Zajac, M. Clerici, R.E. Gress, R.N. Boswell, and B. Golding. 1989. Common epitope in HIV1-gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive

- autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in
and infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83: 1430
13. Mann, D.L., F. Lasane, M. Popovic, L.O. Arthur, W.G. Robey, W.A. Blatt
and N.J. Newman. 1987. HTLV-III B large envelope protein (gp)
suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.*
2640
14. Viscidi, R.P., K. Mayur, H.M. Lederman, and A.D. Frankel. 1989. Inhibition
of antigen-induced lymphocyte proliferation by tat protein
HIV-1. *Science* 246: 1606
15. Schnittman, S.M., H.C. Lane, J. Greenhouse, J.J. Justement, M. Baseler,
A. Fauci. 1990. Preferential infection of CD4⁺ memory T cells by HIV-1.
Evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed
in infected individuals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 6058
16. Van Noesel, C.J.M., R.A. Gruters, F.G. Terpstra, P.T.A. Schellekens, R.
van Lier, and F. Miedema. 1990. Functional and phenotypic evidence for
selective loss of memory T cells in asymptomatic HIV-infected men.
Clin. Invest. 86: 293
17. Ameisen, J.C., and A. Capron. 1991. T-cell dysfunction and depletion
in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 4: 102
18. Duvall, E., and A.H. Wyllie. 1986. Death and the cell. *Immunol. Today*
115
19. Smith, C.A., G.T. Williams, R. Kingston, E.J. Jenkinson, and J.J.T. O'Garra
1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death

- apoptosis in immature T cells in thymic culture. *Nature* 337: 181
20. Shi, Y., B.M. Sahai, and D.R. Green. 1989. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridoma and thymocytes. *Nature* 339: 625
21. Jenkinson, E.J., R. Kingston, C.A. Smith, G.T. Williams, and J.J.T. Owen. 1989. Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T-cell receptor repertoire. *Eur. J. Immunol.* 19: 2175
22. McConkey, D.J., P. Hartzell, J.F. Amador-Perez, S. Orrenius and M. Jondal. 1989. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T-cell receptor complex. *J. Immunol.* 143: 1801
23. Nieto, M.A., A. Gonzalez, A. Lopez-Rivas, F. Diaz-Espada, and F. Gambo. 1990. IL2 protects against anti-CD3 induced cell death in human medullary thymocytes. *J. Immunol.* 145: 1364
24. Blackman, M., J. Kappler, and P. Murrack. 1990. The role of the T-cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* 248: 1335
25. Williams, G.T., C.A. Smith, E. Spooner, M. Dexter, and D.R. Taylor. 1990. Haematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343: 76
26. Ucker, D.S., J.D. Ashwell, and G. Nickas. 1989. Activation-driven T-cell death. 1. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. *J. Immunol.* 143: 3461

27. Odaka, C., H. Kizaki, and T. Tadakuma. 1990. T-cell receptor-mediated DNA fragmentation and cell death in T-cell hybridoma. *J. Immunol.*⁸144: 2096
28. Wyllie, A.H., and R.G. Morris. 1982. Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment *Am. J. Pathol.* 109: 78
29. McConkey, D.J., P. Hartzell, S.C. Chow, S. Orrenius, and M. Jondal. 1990. Agents that elevate cAMP stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J. Immunol.*, 145: 1227
30. McConkey, D.J., S. Orrenius, and M. Jondal. 1990. Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today*, 11: 120-121
31. Marrack, P., and J. Kappler. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* 248: 705
32. Groux H., S. Huet, H. Valentin, D. Pham, and A. Bernard. 1989. Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by the CD29 molecule of CD4⁺ lymphocytes. *Nature* 339: 152
33. Newell, M.K., L.J. Haughn, C.R. Maroun, and M.H. Julius. 1990. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 347: 286
34. Miedema, F., M. Tersmette, and R.A.W. VanLier. 1990. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today* 11: 293

35. Wyllie, A.H., J.F.R. Kerr, and A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68: 251
36. Lindsten, T., C.H. June, J.A. Ledbetter, G. Stella, and C.B. Thompson. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface mediated T-cell activation pathway. *Science* 244: 339
37. Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and A. Weiss. 1991. Regulation of IL-2 gene enhancer activity by the T-cell accessory molecule CD28. *Science.* 251: 313
38. Huet, S., H. Groux, B. Caillou, H. Valentin, A.M. Prieur, and A. Bernard. 1989. CD44 contributes to T-cell activation. *J. Immunol.* 143: 798
39. Gougeon, M.L., R. Olivier, S. Garcia, D. Guetard, T. Dragic, C. Dauguet, and L. Montagnier. 1991. Mise en évidence d'un processus d'engagement vers la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 312: 529
40. Terai, C., R. Kornbluth, C. Pauza, D. Richman, and D. Carson. 1991. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* 87: 1710
41. Liu, Y., and C. Janeway. 1990. INF γ plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 172: 1735
42. Pinching, A.J., and K.E. Nye. 1990. Defective signal transduction. A common mechanism for cellular dysfunction in HIV infection ? *Immunol. Today* 11: 256

43. Ju, S.T. 1991. Distinct pathways of CD4⁺ and CD8⁺ cells induce rapid target DNA fragmentation. *J. Immunol.* 146: 812
44. Cole, B.C., and C.L. Atkin. 1991. The mycoplasma arthridis T-cell mitogen, MAM: a model superantigen. *Immunol. Today* 12: 271
45. Choi, Y.W., J.W. Kappler, and P. Marrack. 1991. A superantigen encoded in the open reading frame of the 3' long terminal repeat of mouse mammary tumor virus. *Nature*; 350: 203

Legends

Figure 1. Proliferative response of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls.

A) Histograms represent the mean \pm S.D. of measurement of $^3\text{[H]}$ -thymidine incorporation of T cells from 100 HIV-infected asymptomatic individuals (HIV-infected) and from 40 HIV-seronegative healthy controls (controls 1) incubated with medium alone, PHA ($10\mu\text{g/ml}$), PWM ($10\mu\text{g/ml}$), superantigens (SEB) ($1\mu\text{g/ml}$), and the tetanus toxoid (TT) recall antigen ($10\mu\text{g/ml}$). The specific activity of the $^3\text{[H]}$ -thymidine used was 1Ci/mmol .

B) Histograms represent the mean \pm S.D. of measurement of $^3\text{[H]}$ -thymidine incorporation of T cells from 9 HIV-infected asymptomatic individuals (HIV-infected), from 9 HIV-seronegative healthy controls (controls 1) and from 9 HIV-seronegative patients suffering from acute or chronic infectious diseases (controls 2) incubated with medium alone, PHA, PWM and SEB as described in A. The specific activity of the $^3\text{[H]}$ -thymidine used was 25Ci/mmol .

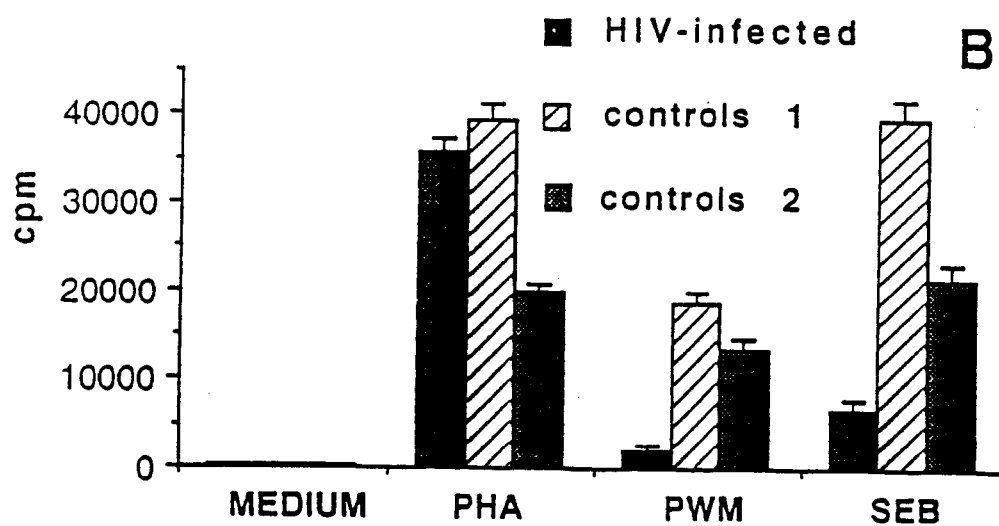
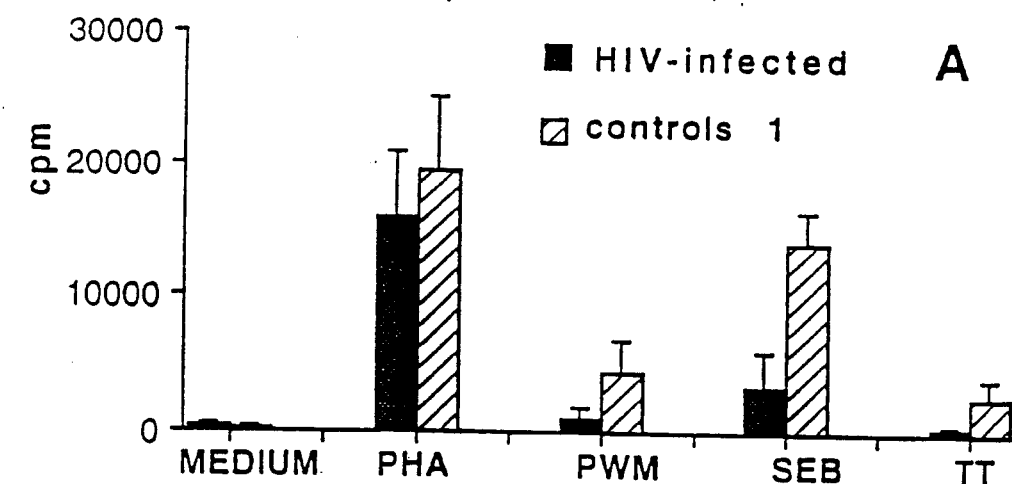


Fig. 1

Figure 2. Cell death in PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls after *in vitro* culture with PWM and SEB.

A) Histograms represent the mean \pm S.D. of triplicate measurements of the percentage of cell mortality in PBMC from 50 different HIV-infected asymptomatic individuals (1) and 40 controls (2), 48h after incubation with medium alone, PHA (10 μ g/ml), PWM (10 μ g/ml), or SEB (1 μ g/ml), in the absence or in the presence of cycloheximide (50 μ g/ml), cyclosporin A (CsA) (200ng/ml), or CD28 mAb (10 μ g/ml). Cell death was assessed by trypan blue permeability.

B) Histogram represent the mean \pm S.D. of triplicate measurements of the percentage of cell mortality in PBMC from 9 different HIV-infected asymptomatic individuals (HIV-infected), 9 HIV-seronegative controls (controls 1) and 9 HIV-seronegative patients suffering from acute or chronic infectious diseases (controls 2), 48h after incubation with medium alone, PHA, PWM or SEB as described in A.

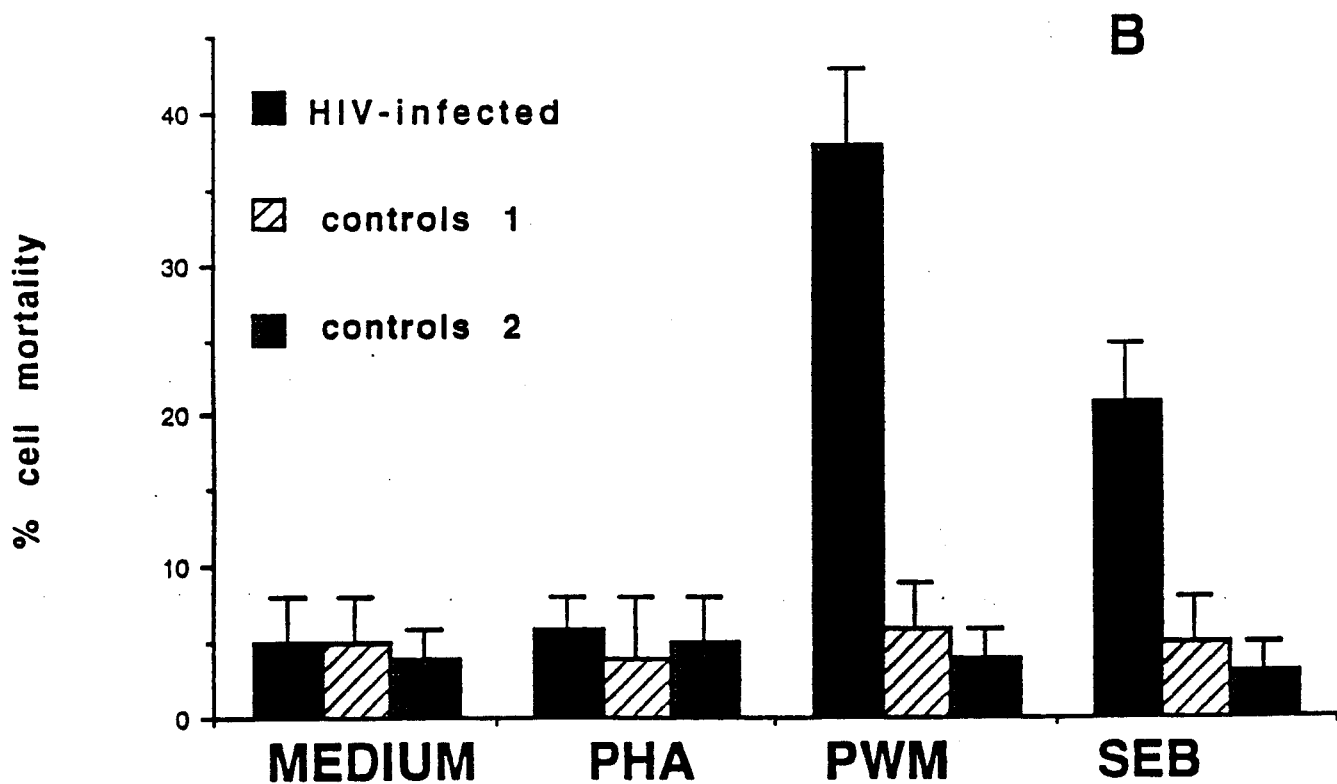
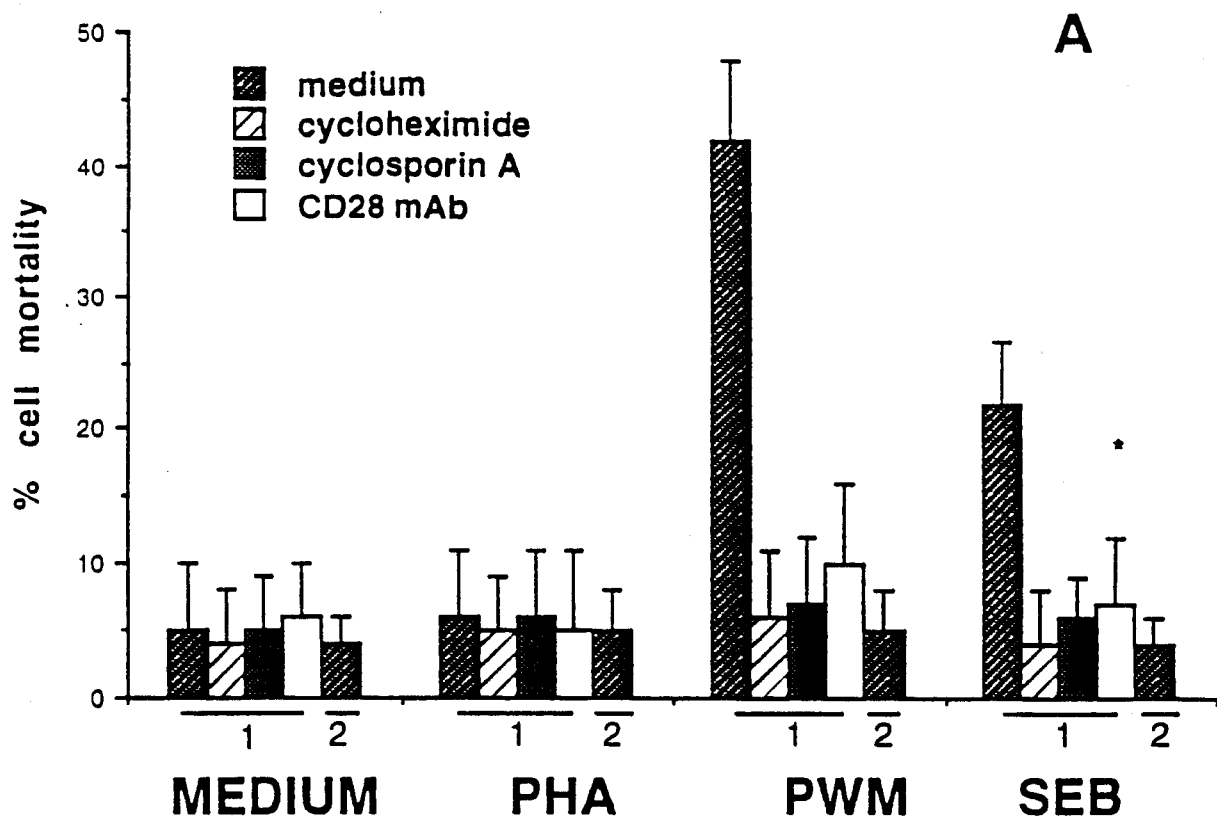


Figure 3. Cell death in purified T-cell populations from HIV-infected asymptomatic individuals and from controls after *in vitro* culture with PWM and SEB.

A) Histograms represent the mean \pm S.D. of triplicate measurement of cell mortality in CD8⁺ T cell- or CD4⁺ T cell-depleted PBMC from 12 HIV-infected asymptomatic individuals (1) and 4 controls (2). T-cell proliferation was also measured by ³[H]-thymidine (25Ci/mmol) incorporation after 3 days; the CD8⁺ T cell-depleted PBMC from controls proliferated to PWM (16,828 \pm 4,247cpm) and to SEB (31,327 \pm 8,624cpm), whereas neither the CD4⁺ T-cell-depleted PBMC from the control, nor the CD8⁺ or CD4⁺ T-cell-depleted PBMC from the HIV-infected asymptomatic individual proliferated to either stimuli.

B) Histograms represent the mean \pm S.D. of triplicate measurement of cell mortality in purified (98% pure) CD4⁺ and CD8⁺ T cells from 2 HIV-infected asymptomatic individuals (1, 2) and a control (3). Percentage of CD4 T cells in unpurified PBMC was 50% in individual 1, and 52% in individual 2. T-cell proliferation was also measured by ³[H]-thymidine (1Ci/mmol) incorporation after 3 days; purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-infected individuals and from the control proliferated normally to PHA. CD4⁺ T cells from control proliferated in response to PWM (4,817 \pm 351 cpm) and to SEB (21,892 \pm 1,628 cpm), whereas CD8⁺ T cells from the control and CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the HIV-infected individual did not proliferate to either stimuli.

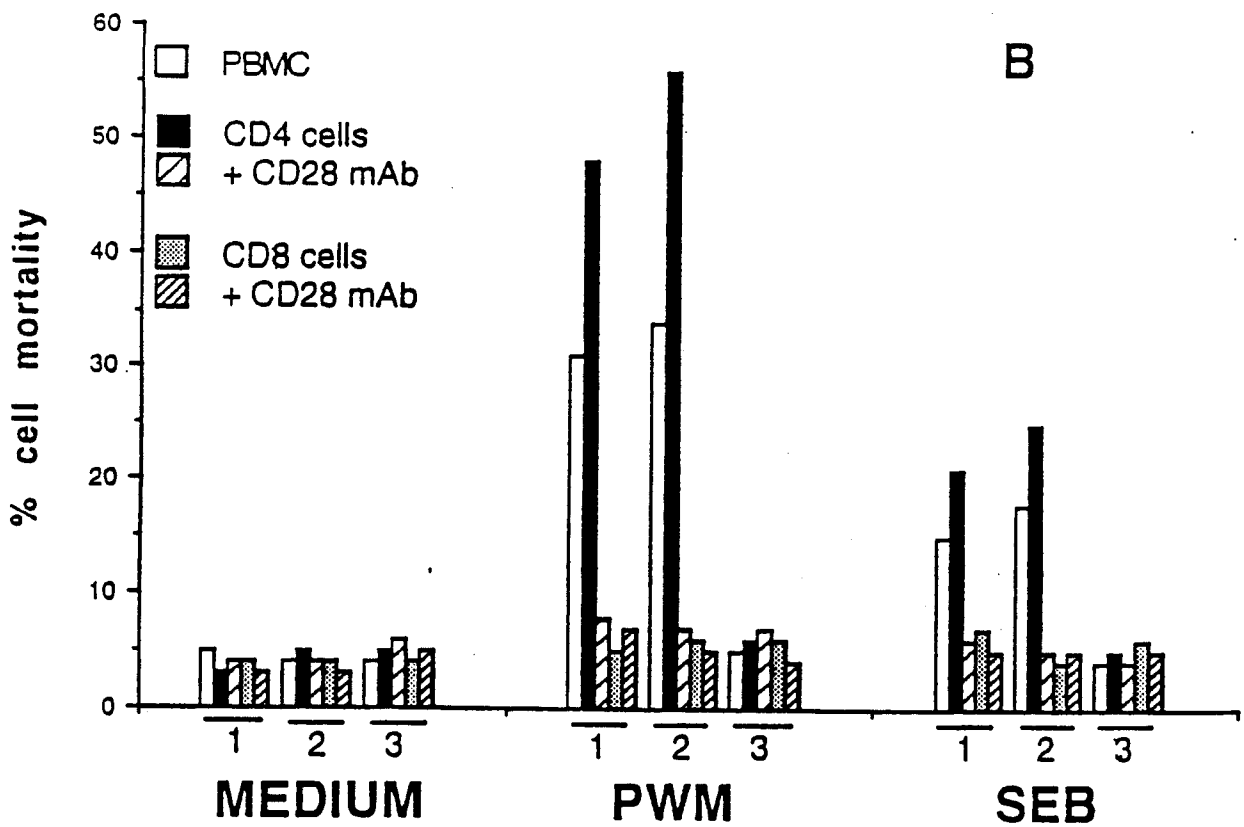
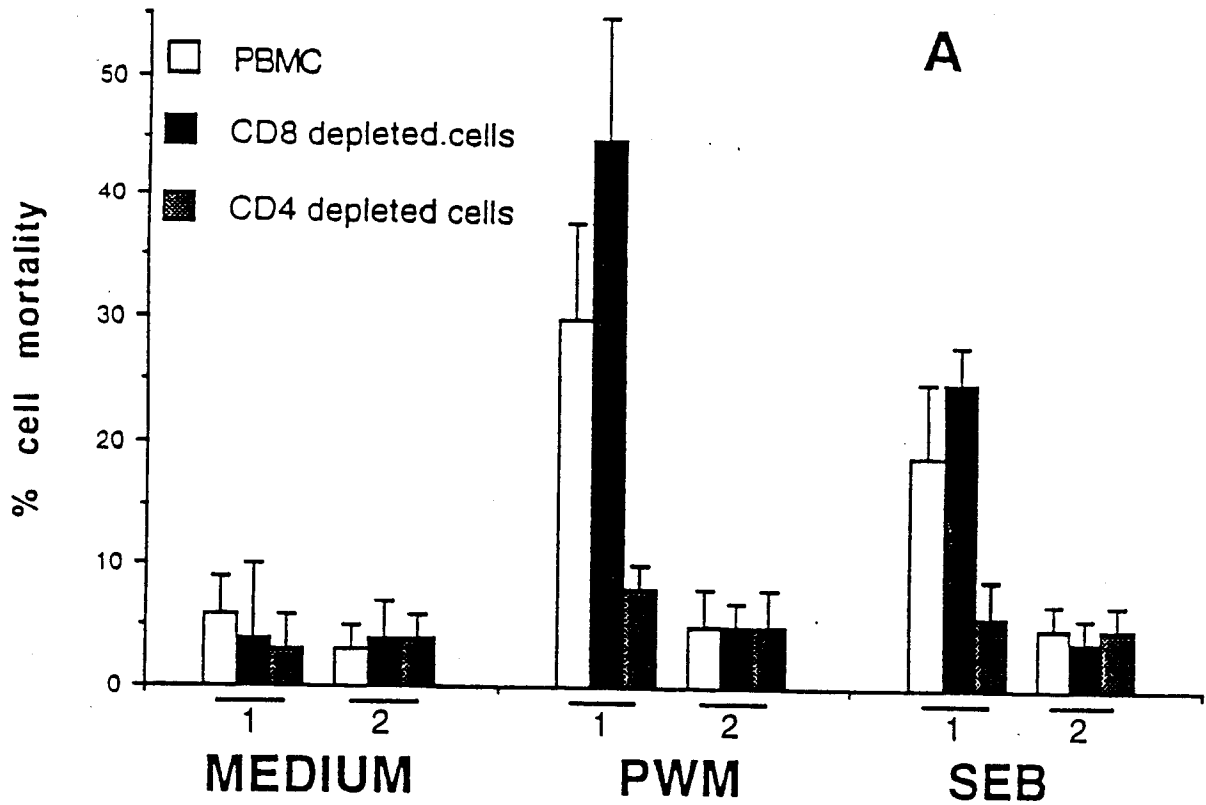


Fig. 3

Figure 4. Apoptosis of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals in response to PWM or SEB.

a) DNA fragmentation in PBMC from HIV-infected asymptomatic individuals and controls after overnight incubation with medium alone, PWM (5 μ g/ml) or SEB (1 μ g/ml) in the absence or presence of cyclosporin A (200ng/ml) or CD28 mAb. DNA weight markers (lane 1); control PBMC with PWM (lane 2); PBMC from 8 HIV-infected asymptomatic individuals with: medium (lanes 3, 12), PWM (lanes 4-9, 13) or SEB (lanes 10,11). Lanes 3-4 and lanes 12-14: cells from the same individuals. Lanes 4-6 and 8-11 and 13 show a clear ladder of degraded DNA bands which are multiple of 200 base pairs, characteristic for apoptosis (10-13, 17-19). DNA fragmentation was suppressed when cyclosporin A (lane 7, cells from same individual as lane 6) or CD28 mAb (lane 14, cells from same individual as lane 13) were added to PWM.

b and c) Electron micrographs of PBMC from a HIV-infected asymptomatic individual after 24h incubation with **b**: medium or **c**: PWM (5 μ g/ml). Cells showing various stages of chromatin condensation, characteristic for apoptosis (10, 17, 19, 20), can be seen in **c** (arrows). Bars= 5 μ m.

a 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 ¹⁶⁰

1709
947
831
564

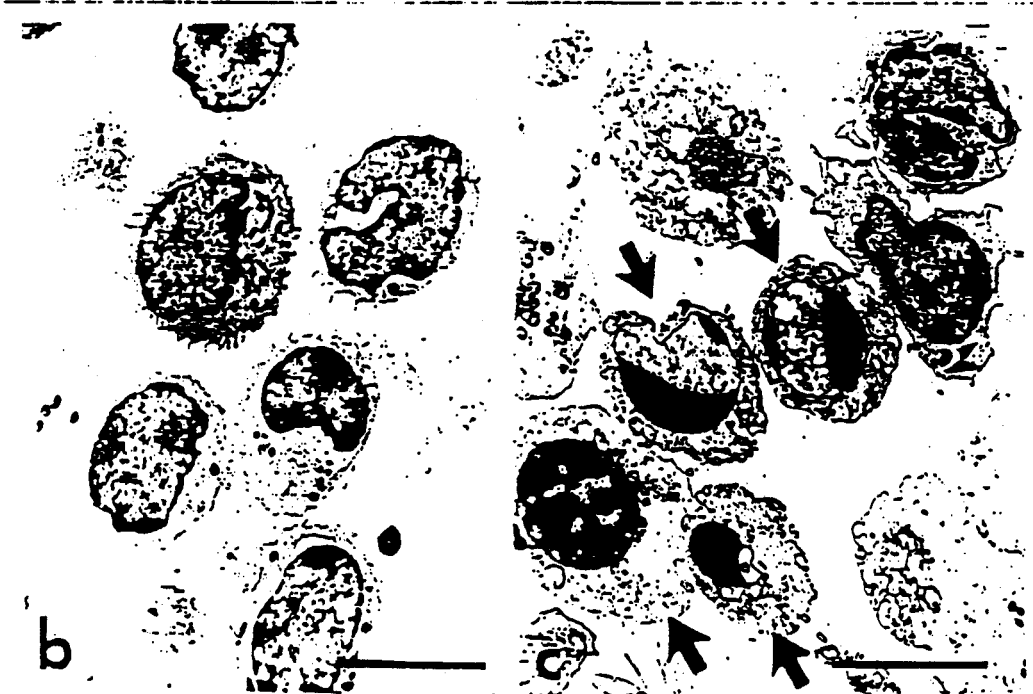
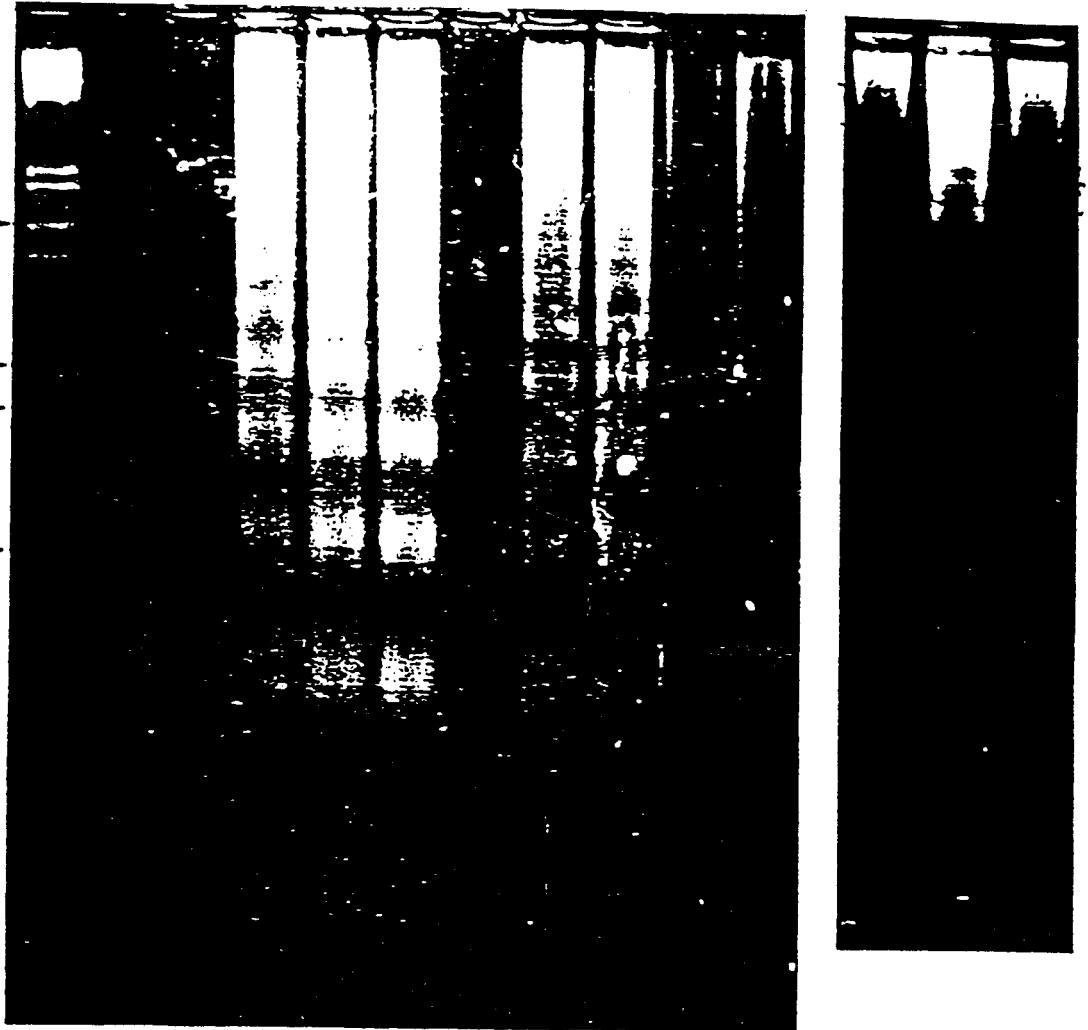


Fig. 4

Figure 5. Effect of CD28 mAb on the proliferative response of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals.

Circles represent the mean \pm S.D. of triplicate measurement of ^3H -thymidine incorporation of T cells from a) each of 19 HIV-infected asymptomatic individuals incubated with PWM, SEB, TT, or medium alone, in the absence (●) or presence (○) of CD28 mAb (specific activity of ^3H -thymidine used, 1 Ci/mmol), and from b) each of 15 HIV-infected asymptomatic individuals incubated with PWM, SEB, TT, or medium alone, in the absence (●) or presence (○) of CD28 mAb (specific activity of ^3H -thymidine used, 25 Ci/mmol).

(Certain circles representing similar values are superposed).

* = $p < 0.00004$

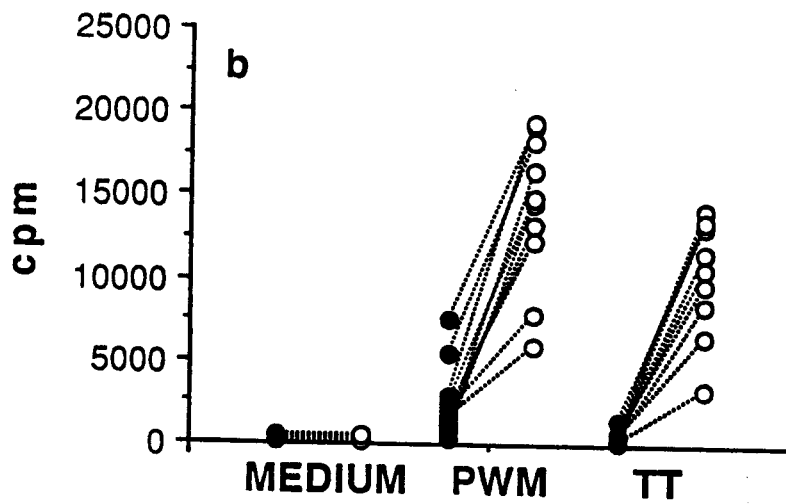
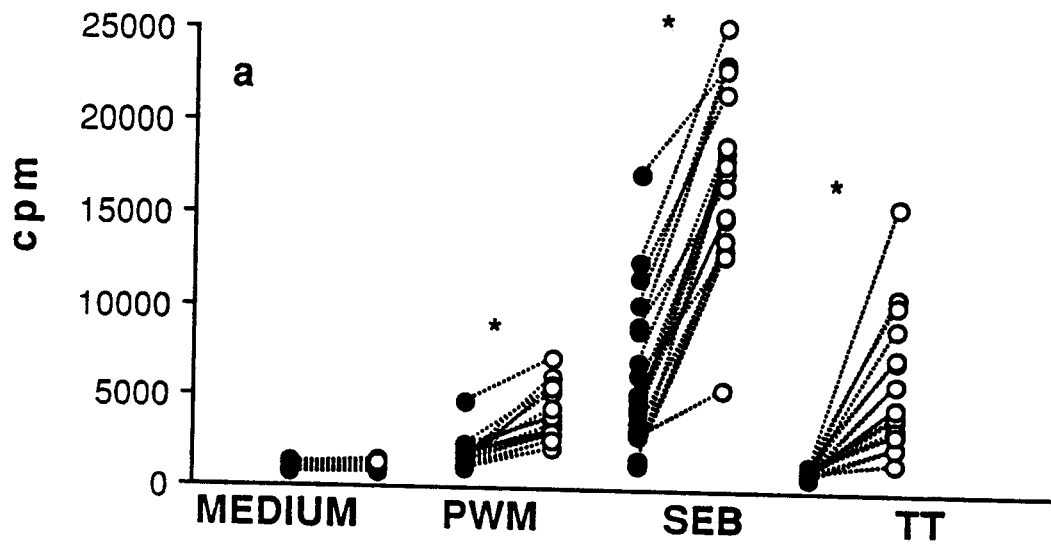


Table 1. *In vitro* effect of AZT on T-cell proliferation and death of T cells from HIV-infected asymptomatic individuals and controls

Results represent mean \pm S.D. of triplicate measurements of $^3\text{[H]}$ -thymidine incorporation of PBMC and the percentage of cell mortality at 48h from 4 HIV-infected asymptomatic individuals and from 2 controls in response to medium alone, PHA and PWM in the presence or absence of 10^{-5}M of AZT. At 10^{-5}M , AZT inhibited syncytia formation in the MT2 CD4^+ T-cell line infected with 100 X TCID 50 of a purified preparation of the HTLV-III_B strain of HIV₁.

TABLE 1

	Proliferation (cpm)			Mortality (percent)		
	medium	PWM	PHA	medium	PWM	PHA
Patient A	180	3604	44567	7	34	7
+ AZT	152	2846	46567	10	32	6
Patient B	395	2138	51299	6	28	5
+ AZT	432	3027	47321	7	31	6
Patient C	204	1873	17556	6	23	5
+ AZT	396	1846	19122	5	29	7
Patient D	818	2491	25284	4	38	5
+ AZT	396	3936	33336	5	36	4
Control A	321	13227	17754	6	5	6
+ AZT	244	12521	14081	4	6	5
Control B	467	18532	37317	5	4	7
+ AZT	383	21123	34821	6	5	7

Table 2. Antigen-mediated functional deletion of antigen-specific memory T cells from HIV-infected asymptomatic individuals.

Results represent mean \pm SD of triplicate measurements of $^3\text{[H]}$ -thymidine incorporation of PBMC from 4 HIV-infected asymptomatic individuals and from 2 controls. Results showing functional deletion are underlined. Preincubation with TT: PBMC ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured for 10 days with the tetanus recall antigen (TT) ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were then incubated with different stimuli, and proliferation measured by $^3\text{[H]}$ -thymidine incorporation after 3 days for PHA or PWM and 6 days for TT or Influenza A recall antigens (Infl) ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), in the presence or absence of CD28 mAb ($10\mu\text{g}/\text{ml}$).

TABLE 2.

Antigen-mediated functional deletion of antigen-specific memory T cells from HIV-infected asymptomatic individuals.

Preincubation		Thymidine incorporation (cpm)						
		medium	CD28	TT	TT+CD28	Infl	Infl+CD28	PHA
HIV+ 1	No preincubation	121±52	314±87	236±78	2617±321	341±58	3217±206	18621±817
	with TT	614±87	258±94	318±97	<u>415±87</u>	721±75	6731±345	17182±751
HIV+ 2	No preincubation	447±34	313±57	317±27	5736±187	151±57	3842±137	17980±243
	with TT	221±67	318±61	176±50	<u>118±21</u>	345±46	5351±142	16441±419
HIV+ 3	No preincubation	324±38	249±64	437±31	3781±108	438±51	6242±107	28143±243
	with TT	479±61	408±37	459±61	<u>438±71</u>	386±48	2674±157	24597±267
HIV+ 4	No preincubation	350±217	405±104	157±117	1549±817	108±64	1560±258	28232±6712
	with TT	103±37	207±83	483±121	<u>342±106</u>	435±265	2170±598	23315±4612
Control 1	No preincubation	680±217	354±70	3930±881	3290±721	2314±567	3254±432	31217±2642
	with TT	569±258	208±62	7091±932	4382±792	2090±589	1850±678	27218±4812
Control 2	No preincubation	477±81	387±73	4830±523	4087±238	5721±267	4239±540	20587±267
	with TT	297±54	579±69	5761±287	5983±345	3549±138	4820±534	31589±354

Results represent mean \pm SD of triplicate measurements of ^3H -thymidine incorporation of PBMC from 4 HIV-infected asymptomatic individuals and from 2 controls. Results showing functional deletion are underlined. Preincubation with TT: PBMC ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured for 10 days with the tetanus recall antigen (TT) ($10\mu\text{g}/\text{ml}$). Cells were then incubated with different stimuli, and proliferation measured by ^3H -thymidine incorporation after 3 days for PHA or PWM and 6 days for TT or Influenza A recall antigens (Infl) ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), in the presence or absence of CD28 mAb ($10\mu\text{g}/\text{ml}$).

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- 1) Buus S., Colon S., Smith C., Freed J.H., Miles C., Grey H.-1987- Interaction between a "processed" ovalbumin peptide and Ia molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3968-72.
- 2) Buus S., Sette A., Colon S.M., Miles C., Grey H.M.-1987- The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. Science 235 : 1353-54.
- 3) Babbitt B.P., Allen P.M., Matsueda G., Haber E., Unanue E.R.-1985- Binding of immunogenic peptide to Ia molecules. Nature 317 : 359-61.
- 4) Ohashi P.S., Mak T.W., van den Elsen P., Yanagi Y., Yoshikai Y., Calman A.F., Terhorst C., Stobo J.D., Weiss A.-1985- Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. Nature 316 : 606-8.
- 5) Kaye J., Jones B., Janeway C.A.-1984- The structure and function of T cell receptor complexes. Immunol. Rev. 81 : 39-48.
- 6) Reinherz E.L., Acuto O., Fabbi M., Bensussan A., Milanese C., Royer H.D., Meuer S.C., Schlossman S.F.-1984- Clonotypic surface structure on human T lymphocytes : functional and biochemical analysis of the antigen receptor complex. Immunol. Rev. 81 : 95-103.
- 7) Hannum C., Freed J.H., Tarr J., Kappler J., Marrack P.-1984- Biochemistry and distribution of the T cell receptor. Immunol. Rev. 81 : 161-171.
- 8) Mak T.W., Yanagi Y.-1984- Genes encoding the human T cell receptor. Immunol. Rev. 81 : 184-96.
- 9) Marrack P., Kappler J.-1987- The T cell receptor. Science 238 : 107-9
- 10) Thorsby E., Berle E., Nousiainen H.-1982- HLA-D region molecules restrict proliferative T-cell response to antigen Immunol. Rev. 66 ?
- 11) Grey H.M., Chesnut R.-1985- Antigen processing and presentation to T-cells Immunol. Today 6 : 101-5.
- 12) Geppert T.D., Lipski P.E.-1985- Antigen expression by gamma-interferon-treated endothelial cells and fibroblasts : differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. J. Immunol. 135 : 3750-61.
- 13) Geppert T.D., Lipski P.E.-1987- Dissection of defective antigen presentation by interferon-gamma-treated fibroblasts. J. Immunol. 138 : 385-92.
- 14) Oettgen H.C., Kappler J., Tax W.J.M., Terhorst C.-1984- Characterization of the two heavy chains of the T3 complex on the surface of human T lymphocytes. J. Biol. Chem. 259 : 12039-43.

- 15) Weiss A., Imboden J., Hardy K., Manger B., Terhorst C., Stobo J.-1986- The role of the T3/antigen receptor complex in T-cell activation. *Ann. Rev. Immunol.* 4 : 593-602.
- 16) Van Wauwe J.P., De Mey J.R., Goosens J.G.-1980- OKT3 : a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties *J. Immunol.* 124 : 585-9.
- 17) Van Wauwe J., Goosens J.-1981- Mitogenic actions of orthoclone OKT3 on human peripheral blood lymphocytes : effects of monocytes and sérum componants. *Int. J. Immunopharmacol.* 3 : 203-9.
- 18) Palacios R.-1985- Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. *Eur. J. Immunol.* 15 : 645-51.
- 19) Bockenstedt L.K., Goldsmith M.A., Dustin M., Olive D., Springer T.A., Weiss A.-1988- The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. *J. Immunol.* 141 : 1904-10.
- 20) Bamesei A., Reiser H., Rock K.-1988- T cell receptor/CD3 negative variants are unresponsive to stimulation through the LY-6 encoded molecule, TAP. *J. Immunol.* 141 : 1423-29.
- 21) Gunter K.C., Germain R.N., Kroczeck R.A., Saito T., Yokohama W.M., Chang C. Weiss A., Shevach E.M.-1987- Thy-1 mediated T-cell activation requires co-expression of CD3/Ti complex. *Nature* 326 : 505-7.
- 22) Fleischer B., Sturm E., De-Vries J.E., Spits H.-1988- Triggering of cytotoxic T lymphocytes and NK cells via the Tp 103 pathway is dependant on expression of the T cell receptor/CD3 complex. *J. Immunol.* 141 : 3758-63.
- 23) Weiss A., Imboden J., Shoback D., Stobo J.-1984- Role of T3 surface molecules in human T-cell activation : T3-dependant activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 4169-72.
- 24) Imboden J.B., Pattison G.-1987- Regulation of inositol 1,4,5 triphosphate kinase activity after stimulation of human T cell antigen receptor..*J. Clin. Invest.* 79 : 1538-46.
- 25) Isakov N., Altman A.-1987- Human T lymphocyte activation by tumor promoters : role of protein kinase C *J. Immunol.* 138 : 3100-12
- 26) Akermann K.E., Andersson L.C.-1984- Direct mitogenic effect of ionophore A23187 on isolated human T helper lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 14 : 86-91
- 27) Fleisher B. & Schrezenmeier H. -1988- Do CD4 or CD8 molecules provide a regulatory signal in T-cell activation ?*Immunol. Today* 9. 132-34.

- 28) Mentzer S.J., Crimmins M.A., Burakoff S.J., Faller D.W.-1987- Alpha and beta subunits of the LFA-1 membrane molecule are involved in human monocyte endothelial cell adhesion. *J. Cell. Physiol.* 130 : 410-23.
- 29) Wacholtz M.C., Patel S.S., Lipsky P.E.-1989- Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J. Exp. Med.* 170 : 431-42.
- 30) Mustelin T., Altman A;-1989- Do CD4 and CD8 control T-cell activation via a specific tyrosine protein kinase ? *Immunol. Today* 10 : 189-92.
- 31) Meuer S.D., Hussey R.E., Fabi M., Fox D. , Acoto O., Fitzgerald K.A., Hogdon J.C., Protentis J.P., Schlossman S.F., Reinherz E.L.-1984- An alternative pathway of T-cell activation : a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell* 36 : 897-906.)
- 32) Kroczek R.A., Gunter K.C., Seligman B., Shavach E.M. -1986- Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies *J. Immunol.* 136 : 4379-85.
- 33) Rock K.L., Yeh E.T., Gramm C.F., Haber S.I., Reiser H., Benacerraf B.-1986- TAP, a novel T cell-activating protein involved in the stimulation of MHC-restricted T lymphocytes . *J. Exp. Med.* 163 : 315-21.
- 34) Carrera A.C., Rincon M., Sanchez-Madrid F., Lopez-Botet M. de Landazuri M.O.-1988- Triggering of co-mitogenic signals in T cell proliferation by anti-LFA-1 (CD18, CD11a), LFA-3 and CD7 monoclonal antibodies *J. Immunol.* 141 : 1919-25.
- 35) Mentzer S.J., Remold-ODonnel E., Crimmins M.A., Bierer B.E., Rosen F.S., Burakoff S.J.-1987- Sialophorin, a surface sialoglycoprotein defective in the Wiskott-Aldrich syndrome, is involved in human T lymphocyte proliferation. *J. Exp. Med.* 165 : 1383-91.
- 36) Carrel S., Isler P., Salvi S., Giuffre L., pantaleo G., Mach J.P., Cerottini J.C.-1987- Identification of a novel 45 kDa cell surface molecule involved in activation of the human Jurkat T cell line. *Eur. J. Immunol.* 17 : 1395-9.
- 37) Thompson L.F., Ruedi J.M., Glass A., Low M.G., Lucas A.H.-1989- Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J. Immunol.* 143 : 1815-28.
- 38) Carrel S., Salvi S., Giuffre L., Isler P., Cerottini J.C.-1987- A novel 90-kDa polypeptide (Tp90) possibly involved in an antigen-independent pathway of T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 17 : 835-45.

- 39) Isler P., Salvi S., Rapin C., Giuffre L., Cerotini J.C., Carrel S.-1988- Antigen-independent activation of T cells mediated by a novel cell surface heterodimer (Tp135-154) Eur. J. Immunol. 18 : 1491-99.
- 40) Fleischer B.-1987- A novel pathway of human T cell activation via a 103 kD T cell activation antigen. J. Immunol. 138 : 1346-53.
- 41) Davis L.S., Patel S.S., Atkinson J.P., Lipski P.E.-1988- Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. J. Immunol. 141 : 2246-53
- 42) Carrel S., Salvi S., Isler P., Rapin C., Hayoz D., Gallay P., Giuffre L.-1990- gp33-38, an early human T cell activation antigen. J. Immunol. 144 : 2053-62.
- 43) Geppert T.D., Lipsky P.E.-1986- Accessory cell-T cell interactions involved in anti-CD3-induced T4 and T8 cell proliferation : analysis with monoclonal antibodies. J. Immunol. 137 : 3065-72.
- 44) Hara T., Fu S.M., Hansen J.A.-1985- Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen) J. Exp. Med. 161 : 1513-29
- 45) Ceuppens J.L., Baroja M.L.-1986- Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. J. Immunol. 197 : 1816-29)
- 46) Gangemi R.M., Swack J.A., Gaviria D.M., Romain P.L.-1989- Anti-T12, an anti CD6 monoclonal antibody, can activate human T lymphocytes. J. Immunol. 143: 2439-48.
- 47) Huet S., Groux H., Caillou B., Valentin H., Prieur A.M. & Bernard A.-1989- CD44 contributes to T cell activation. J. Immunol. 143 : 798-801.
- 48) Groux H., Huet S., Valentin H., Pham D. & Bernard A.-1989- Suppressor effects and cyclic AMP accumulation by the CD29 molecule of CD4⁺ lymphocytes. Nature 339 : 152-4.
- 49) Ledbetter J.A., Rose L.M., Spooner C.E., Beatty P.G., Martin P.J., Clark E.A.-1985- Antibodies to common leukocyte antigen p220 influence human T cell proliferation by modifying IL2 receptor expression. J. Immunol. 135 : 1819-29.
- 50) Van-Wauwe J., Goosens J., Decock W., Kung P., Goldstein G.-1981- Suppression of human T-cell mitogenesis and E-rosette formation by the monoclonal antibody OKT11A. Immunology 44, 865-9.
- 51) Lay W.H., Mendes N.F., Bianco C., Nussenzweig V.-1971- Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. Nature 230 : 531-2.

- 52) Wybran J., Carr M.C., Funderberg H.H.-1972- The human rosette forming cell as a marker of a population of thymus-derived cells. *J. Clin. Invest.* 51 : 2537-42.
- 53) Kamoun M., Martin P.J., Hansen J.A., Brown M.A., Siadek A.W., Nowinski R.R.-1981-Identification of a human T lymphocyte surface protein associated with the E rosette receptor. *J. Exp. Med.* 153 : 207-12.
- 54) Verbi W., Greeves C., Schneider et al.-1982- Monoclonal antibodies OKT11 and OKT11A have pan-T reactivity and block sheep erythrocyte receptors. *Eur. J. Immunol.* 12 : 81-9.
- 55) Krensky A.M., Sanchez-Madrid F., Robbins E., Nagy J.A., Springer T.A. & Burakoff S.J.-1983-The functional significance distribution and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3 : cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol.* 131 : 611-9.
- 56) Tadmori W., Reed J.C., Nowell P.C. & Kamoun M.-1985- Functional properties of the 50 kd protein associated with the E-receptor on human T lymphocytes : suppression of IL2 production by anti-p50 monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134 : 1709-15.
- 57) Yssel H., Aubry J.P., De Waal Malefijt R., de Vries J. & Spits H -1987- Regulation by anti-CD2 monoclonal antibody of the activation of a human T cell clone induced by anti-CD3 or anti-T cell receptor antibodies. *J. Immunol.* 139 : 2850-55
- 58) Brottier P., Boumsell L., Gelin C. & Bernard A.-1985- T-cell activation via CD2 [T, gp50] molecules. Accessory cells are required to trigger T-cell activation via CD2-D66 plus CD2-9.6/T111 epitopes. *J. Immunol.* 135 : 1624-31.
- 59) Huet S., Wakasugi H., Sterkers G., Gilmour J., Tursz T., Boumsell L. & Bernard A.-1986- T cell activation via CD2 [T, gp50] : the role of accessory cells in activating resting T cells via CD2. *J. Immunol.* 137 : 1420-8.
- 60) Holter W., Majdic O. Stockinger H. , Howard B.H. & Knapp W. -1988- Regulation of the CD2 alternate pathway of T cell activation by CD3. Evidence for heterologous desensitization. *J. Immunol.* 140 : 1043-1046.
- 61) Yang S.Y., Chouaib S. & Dupont B.-1986-A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 sheep erythrocyte receptor determinants. *J. Immunol.* 137 : 1097-1100
- 62) Bierer B.E., Peterson A., Gorga J.C. , Herrmann S.H. & Burakoff S.J. -1988- Synergistic T cell activation via the physiological ligands for CD2 and the T cell receptor. *J. Exp. Med.* 168 : 1145-56.

- 63) Brown M.H., Cantrell D.A., Brattsand G., Crumpton M.J. & Gulberg M. - 1989-The CD2 antigen associates with the T cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* 339:551-3.
- 64) Breitmeyer J.B., Daley J.F., Levine H. & Schlossman S.F.-1987- *J. Immunol.* 139 : 2899-2905. 65) Alcover A., Albertini C., Acuto O? et al. -1988- *EMBO J.* 7 : 1973-77.
- 65) Bockenstedt L.K., Goldsmith M.A., Dustin M., Olive D., Springer T.A. & Weiss A. -1988-The CD2 ligand LFA-3 activates T cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. *J. Immunol.* 141 : 1904-11.
- 66) Alcover A., Cheng H.C., Sayre P.H. Hussey R.E. & Reinherz E.L. -1988-The T11 (CD2) cDNA encodes a transmembrane protein which express T11₁, T11₂ and T11₃ epitopes but which does not independently mediate calcium influx : analysis by gene transfer in a baculovirus system. *Eur. J. Immunol.* 18 : 363-7.
- 67) Siliciano R.F., Pratt J.C., Smidt R.E. , Ritz J. & Reinherz E.L. -1985- Activation of cytolytic T lymphocyte and natural killer cell function through the T11 sheep erythrocyte binding protein. *Nature* 317 : 428-30.
- 68) Anderson P., Caligiuri M., Ritz J. & Schlossman S.F.-1989-CD3-negative natural killer cells express ζ TCR as part of a novel molecular complex. *Nature* 341 : 159-62.
- 69) Rudd C.E.-1990- CD4, CD8 and the TCR-CD3 complex ; a novel class of protein-tyrosine kinase receptor. *Immunol. Today.* 11 : 400-6.
- 70) Hünig T.R.-1985- The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T-lymphocytes. Identification and partial characterization using a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 162 : 890-902.
- 71) Hünig T.R.-1986- The ligand of the erythrocyte receptor of T lymphocytes : expression on white blood cells and possible involvement in T cell activation. *J. Immunol.* 136 : 2103-12.
- 72) Selvaraj P., Dustin M.L., Mitnacht R., Hünig T., Springer T.A. & Plunkett M.L.-1987- Rosetting of human T lymphocytes with sheep and human erythrocytes. Comparison of human and sheep ligand binding using purified E receptor. *J. Immunol.* 138 : 2390-2703.
- 73) Vollger L.W., Tuck D.T., Springer T.A., Haynes B.F. & Singer K.H.-1987- Thymocyte binding to human thymic epithelial cells is inhibited by monoclonal antibodies to CD2 and LFA-3 antigens. *J. Immunol.* 138 : 358-67.
- 74) Krenski 1983. Selvaraj P., Plunkett M.L., Dustin M., Sanders M.E., Shaw S. & Springer T.A.-1987- The T lymphocyte glycoprotein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 326 : 400-3.

- 75) Dustin M.L., Sanders M.E., Shaw, & Springer T.A.-1987- Purified lymphocyte function-associated antigen 3 binds to CD2 and mediates T lymphocyte adhesion. *J. Exp. Med.* 165 : 677-86.
- 76) Dustin M.L., Selveraj P., Mattaliano P. & Springer T.A.-1987-Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 329 : 846-8.
- 77) Bernard A., Aubrit F. Raynal B., Pham D.& Bousmell L. -1988- A T cell surface molecule different from CD2 is involved in spontaneous rosette formation with erythrocytes. *J. Immunol.* 140 : 1802-10.
- 78) Groux H., Huet S., Aubrit F., Tran H.C., Bousmell L. & Bernard A.-1989- A 19 kDa human erythrocyte molecule H19 is involved in rosettes, present on nucleated cells, and required for T cell activation. Comparison of the roles of H19 and LFA-3 molecules in T cell activation. *J. Immunol.* 142 : 3013-20.
- 79) Hünig T., Tiefenthaler K.H., Meyer zum Büschenfelde K.H. & Meuer S.C.-1987- Alternative pathway activation of T-cells by binding of CD2 to its cell-surface ligand. *Nature* 326 298-300.
- 80) Tiefenthaler G., Hünig T., Dustin M.L., Springer T.A. & Meuer S.C.-1987- Purified lymphocyte function-associated antigen 3 and T11 target structure are active in CD2-mediated T-cell stimulation. *Eur. J. Immunol.* 17 : 1847-52.
- 81) Bernard A., Tran H.C.,& Bousmell L.-1987- Three different erythrocyte surface molecules are required for spontaneous T cell rosette formation. *J. Immunol.* 139 : 18-26.
- 82) Deckert M., Kubar J. & Bernard A.-1991- CD58 and CD59 molecules exhibit synergic action in T cell adhesion and activation. *J. Immunol.* (submitted).
- 83) Walsh L.A., Tone M. & Waldmann H.-1991- Transfection of human CD59 complementary DNA into rat cells confers resistance to human complement. *Eur. J. Immunol.* 21 : 847-50.
- 84) Rollis S.A. & Sims P.J.-1990- The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J. Immunol.* 144 : 3478-86.
- 85) Holguin M.H., Fredrick L.R., Bernshaw N.J., Wilcox A. & Parker C.J.-1989- Isolation and characterization of membrane protein from normal human erythrocyte of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* 84 : 7-15.

- 86) Okada H., Nagami Y., Takanashi K., Okada N., Hideshima T., Takizawa H. & Kondo J.-1989- 20 kDa homologous restriction factor of complement resembles T cell activating protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 : 1553-64.
- 87) Meri S., Morgan B.P., Wing M., Jones J., Davies A., Podack E. & Lachmann P.J.-1990- Human protectin (CD59) an 18-20 kDa homologous complement restriction factor, does not restrict perforin mediated lysis. *J. Exp. Med.* 172 : 367-72.
- 88) Stefanova I., Hilgert I., Kristofova H., Brown R., Low M.G. & Horejsi V.-1989- Characterization of a broadly expressed human leukocyte surface antigen MEM-43 anchored in membrane through phosphatidylinositol. *Mol. Immunol.* 26 : 153-62.
- 89) Davies A., Simmons D.L., Hale G., Harrison R.A., Tighe H., Lachmann P.J. & Waldmann-1989- CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med.* 170 : 637-42.
- 90) Gowans J.L.-1957- The effect of continuous re)infusion of lymph and lymphocytes on the output of lymphocytes from the thoracic duct of unanaesthetized rats. *Br. J; Exp. Pathol.* 28 : 67-9.
- 91) Gowans J.L.& Knight E.F.-1964- The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc. Lond. (Biol.)* 159 : 257-82.
- 92) Stevens S.K., Weissman I.L. & Butcher E.C.-1982- Differences in the migration of B and T lymphocytes : organ-selective localization in vivo and the role of lymphocyte-endothelial cell recognition. *J. Immunol.* 128 : 844-51
- 93) Kraal G., Weissman I.L. & Butcher E.C.-1983- Difference in in vivo distribution and homing of T cell subsets to mucosal versus non-mucosal lymphoid organ. *J. Immunol.* 130 : 1097-1102.)
- 94) Guy-Grant D., Griscelli C. & Vassili P.-1978- The mouse gut T lymphocytes, a novel type of T cells. Nature, origin and traffic in normal and graft versus host conditions. *J. Exp. Med.* 148 : 1661-74. Kraal et al.
- 95) Gowans et knight, Stamper H.B., & Woodruff J.J.-1979- An in vitro model of lymphocyte homing I. Characterization of the interaction between thoracic duct lymphocytes and specialized high-endothelial venules of lymph nodes. *J. Immunol.* 119 : 172-9
- 96) Woodruff J.J. , Clarke L.M., & Chin Y.H.-1987-Specific cell adhesion mechanisms determining migrtaion pathways of recirculating lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 5 : 201-22

- 97) Gallatin W.M., Weissman I.L. & Butcher E.C.-1983- A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 303 : 30-3.
- 98) Holzmann B. & Weissman I.L.-1989- Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptors consist of a VLA-4-like a chain associated with either of two integrin β chain, one of which is novel. *EMBO J.* 8 : 1735-41.
- 99) Rasmussen R.A., Chin Y.H., Woodruff J.J. & Easton T.G.-1985- Lymphocyte recognition of lymph node high endothelium. VII. Cell surface proteins involved in edhesion defined by monoclonal anti-HEBFLN (A.11) antibody. *J. Immunol.* 135 : 19-24
- 100) Jalkanen S.T., Reichert R.A., Gallatin W.M., Bargatze R.F., Weissman I.L.& Butcher E.C.-1986- Homing receptors and the control of lymphocytes migration. *Immunol. Rev.* 91 : 36-60.
- 101) Coombe D.R.& Rider C.C.-1989- Lymphocyte homing receptors cloned-a role for anionic polysaccharides lymphocytes adhesion. *Immunol. Today.* 10 : 289-91.
- 102) Stamenkovic I., Amiot M., Pesando J.M. & Seed B.-1989-A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell.* 56 : 1057-62.
- 103) Goldstein L.A., Zhou D.F.H., Picker L.J., Minty C.N., Bargatze R.F., Ding J.F. & Butcher E.C. -1989-A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell.* 56 : 1063-72
- 104) Siegelman M., Van de Rijn M. & Weissman I.L.-1989-Mouse lymph node homing receptor cDNA clone encodes a glycoprotein revealing tandem interaction domains. *Science.* 243 : 1165-72.
- 105) Dalchau R., Kirkley J. & Fabre J.W.-1980-Monoclonal antibody to a human brain granulocyte T lymphocyte antigen probably homologous to the W3/13 antigen of the rat. *Eur. J. Immunol.* 10 : 745-9.
- 106) Flanagan B.F., Dalchau R., Allen A.K. , Daar A.S. & Fabre J.W. -1989- Chemical composition and tissue distribution of the human CDw44 glycoprotein. *Immunology* 67 : 167-75.
- 107) Goodfellow P.N., Banting G., Wiles M.W. , Tunacliffe A., Parker M., Solomon E., Dalchau R. & Fabre J.W. -1982- The gene MIC4, which control expression of the antigen defined by monoclonal antibody T10-44-2 is on human chromosome 11. *Eur. J. Immunol.* 12 : 659-63.

- 108) Hughes E.N. & August J.R.-1981-Murine cell surface antigen. Characterization of a major component of 80,000 daltons as a polymorphic differentiation antigen of mesenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 256 : 7023-27
- 109) Hughes E.N., Colombatti A. & August J.T. -1983-Murine cell surface glycoproteins. Purification of the polymorphic Pgp-1 antigen and analysis of its expression on macrophages and other myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 258 : 1014-1021
- 110) Jacobson K., O'Dell D., Holifield B. et al.-1984- Redistribution of a major cell surface glycoprotein during cell movement. *J. Cell. Biol.* 99 : 1613-23.
- 111) Trowbridge I.S., Lesley J., Schulte R. et al. -1982- *Immunogenetics* 15 : 299-312.
- 112) Trowbridge I.S., Lesley J., Trotter J. & Hyman R. -1985-Thymocyte subpopulation enriched for progenitor with an unrearranged T-cell receptor β -chain gene. *Nature* 315 : 666-9.
- 113) Isake C.M., Sauvage C.A., Hyman R. et al. -1986- *Immunogenetics* 23 : 326-32.
- 114) Holmes K.L. & Morse H.C.-1988-Murine hematopoietic cell surface antigen expression. *Immunol. Today* 9 : 344-50.
- 115) Carter W.G.-1982-The cooperative role of the transformation-sensitive glycoproteins, gp140 and fibronectin, in cell attachment and spreading. *J. Biol. Chem.* 257 : 3249-3257.
- 116) Carter W.G. & Wayner E.A.-1988-Characterization of the class III collagen receptor, a phosphorylated, transmembrane glycoprotein expressed in nucleated human cells. *J. Biol. Chem.* 263 : 4193-4201.
- 117) Haynes B.F., Harden E.A., Telen M.J. et al.-1983- Differentiation of T lymphocytes. I. Acquisition of a novel human cell surface protein (p80) during normal intrathymic T cell maturation. *J. Immunol.* 131 : 1195-1200.
- 118) Haynes B.F., Telen M.J., Hale L.P. & Denning S.M.;-1989- CD44-a molecule involved in leucocyte adherence and T-cell activation. *Immunol. Today* 10 : 423-8.
- 119) Lucas M.G., Green A.M. & Telen M.J.-1989-Characterization of the serum In(Lu)-related antigen : Identification of a serum protein related to erythrocyte p80. *Blood* 73 : 596-600.
- 120) Letarte M., Iturbe S. & Quackenbush E.J.-1985-Further characterization of erythrocyte p80 and the membrane protein defect of In(Lu) erythrocytes. *Mol. Immunol.* 22 : 113-9.

- 121) Telen M.J., Rogers I. & Letarte M.-1987- A glycoprotein of molecular weight 85,000 on human cells of B-lineage : detection with a family of monoclonal antibodies. *Blood* 70 : 1475-81.
- 122) Jalkanen S.T., Bargatze R.F., Herron L.R. & Butcher E.C.-1986- A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J. Immunol.* 16 : 1195-1202.
- 123) Jalkanen S.T., Steere A.C., Fox R.I. & Butcher E.C.-1986-A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 233 : 556-8.
- 124) Gallatin W.M., Wayner E., St John T., Butcher E.C. & Carter W.-1989- Structural homology between lymphocyte receptors for high endothelium and class III extracellular matrix receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 4654-8.
- 125) Cobbold S., Hale G. & Waldmann H.-1987- in *Leukocyte Typing III : White Cell Differentiation Antigens* (A. J. McMichael, ed.), pp. 788-803, Oxford University Press.
- 126) Denning S.M., Le P.T., Singer K.A., & Haynes B.F.-1989-Antibodies against CD44, p80, lymphocyte homing receptor augment T cell activation via the CD2 pathway. *Faseb J.* 3 : A785
- 127) Willeford D.M., Hoffman P.A. & Gallatin W.M.-1989- Expression of lymphocyte adhesion receptors for high endothelium in primates. *J. Immunol.* 142 : 3416-22.
- 128) Shimizu Y., Van Seventer G.A., Siraganian R., Wahl L. & Shaw S. - 1989- Dual role of the CD44 molecule In T cell adhesion and activation *J. Immunol.* 143 : 2457-63.
- 129) Streeter P.R., Lakey-Berg E., Rouse B.N., Bargatze R.F. & Butcher E.C.- 1988-A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* 331 : 41-6
- 130) Dailey W., Gallatin W.M. & Weissman I.L.-1985- The in vivo behavior of T cell clones; altered migration due to loss of the lymphocyte surface homing receptor. *J. Mol. Cell. Immunol.* 2 : 27-35.
- 131) Denning S.M., Kurtzberg J., Leslie D. & Haynes B.F.-1989-Human postnatal CD4⁻ CD8⁻ CD3⁻ thymic T cell precursors differentiate in vitro into T cell receptor δ -bearing cells. *J. Immunol.* 142 : 2988-97.
- 132) Marcantonio E.E., Hynes R.O.-1988-Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin β_1 sub-unit react with protein in vertebrates, invertebrates and fungi. *J. Cell Biol.* 106 : 1765-72

- 133) Phillips D.R., Charo I.F., Parise L.V. Fitzgerald L.A.-1988_ The platelet membrane glycoproteine IIb-IIIa complex. *Blood*, 71 : 831-43.
- 134) Ruoslahti E., Pierschbacher M.D.-1987- New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins. *Science* 238 : 491-97.
- 135) Ruoslahti E.-1988- Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57 : 375-413.
- 136) Buck C.A., Horwitz A.F.-1987-Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3 : 179-205.
- 137) Leptin M., Bogaert T., Lehmann R., Wilcox M.-1989. The function of PS integrins during *Drosophila* embryogenesis. *Cell.* 56 : 401-8.
- 138) Krotoski D.M., Domingo C., Broner-Fraser M.-1986-Distribution of a putative cell surface receptor for fibronectin and laminin in the avian embryo. *J. Cell Biol.* 103 : 1061-71.
- 139) Anderson D.C., Schmalstieg F.C., Shearer W., Becker-Freeman K. Kohl S., Smith C.W., Tosi M.F., Springer T.-1985- Leukocytes LFA-1, OKM1, p150, 95 deficiency syndrome : functional and biosynthetic studies of three kindreds. *Fed. Proc.* 44 : 2671-77.
- 140) Hemler M.E.-1988-Adhesive protein receptors on hematopoietic cells. *Immunol. Today* 41 : 109-13.
- 141) Hemler M.E., Huang C., Schwarz L.- The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight β subunit. *J. Biol. Chem.* 262 : 3300-12.
- 142) Hemler M.E., Huang C., Takada Y. Schwarz L., Strominger J.L., Clabby M.L.-1987- Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides *J. Biol. Chem.* 262 : 11478-72
- 143) Hemler M.E.-1990- VLA proteins in the integrin family : structures, functions and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8 : 365-400.
- 144) Sanchez-Madrid F. De Landazuri M.O., Morago G., Cebrian M., Acevedo A., Bernabeu C.-1986- VLA-3 : a novel polypeptide association within the VLA molecular complex : cell distribution and biochemical characterization. *Eur. J. Immunol.* 16 : 1343-46.
- 145) Wayner E.A., Garcia-Pardo A., Humphries M.J. McDonald J.A., Carter W.G.-1989-Identification and characterization of tyhe lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain in plasme fibronectin. *J. Cell. Biol.* 109 : 1321-30.
- 146) McIntyre B.W., Evans E.L. & Bednarczyk J.L.-1989- Lymphocyte surface antigen L25 is a member of the integrin receptor superfamilly. *J. Biol. Chem.* 264 : 13745-43.

- 147) Hemler M.E., Elices M.J., Parker C. & Takada Y.-1990- Structure of the integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions. *Immunol. Rev.* 114 : 44-65.
- 148) Holzmann Weissman EMBO, Holzmann B., McIntyre B.W., Weissman I.L.-1989- Identification of a murine peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin with an α chain homologous to human VLA-4a. *Cell* 56 : 549-56.
- 149) Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyj S., Chi-Rosso G., Lobb R.-1989- Direct cloning of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), a cytokine induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59 : 1203-11.
- 150) Elices M.J., Osborn L., Takada Y., Crouse C., Luhowskyj S., Hemler M.E., Lobb R.R.-1990- VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* (in press)
- 151) Rice G.E. & Bevilacqua M.P.-1989- An inducible endothelial cell surface glycoprotein mediates melanoma adhesion. *Science* 246 : 1303-6.
- 152) Rice G.E., Munro J.M. & Bevilacqua M.P.-1990- Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM 110) is an endothelial receptor for lymphocytes : a CD11/CD18-independent adhesion mechanism. *J. Exp. Med.* (in press).
- 153) Osborn L., Hession C., Tizard R., Vassallo C., Luhowskyj S., Chi-Rosso G. & Lobb R.-1989- Direct cloning of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 59 : 1203-12.
- 154) Clayberger C., Krensky A.M., McIntyre B.W., Koller T.D., Parham P., Brodsky F., Linn D.J. & Evans E.L.-1987- Identification and characterization of two novel lymphocyte function-associated antigens L24 and L25. *J. Immunol.* 138 : 1510-9.
- 155) Takada Y., Elices M.J., Crouse C. & Hemler M.E.-1989- The primary structure of the $\alpha 4$ subunit of VLA-4 : homology to other integrins and a possible cell-cell adhesion function. *EMBO J.* 8 : 1361-72.
- 156) Bednarczyk J.L., McIntyre B.W.-1990- Induction of lymphocyte aggregation by mAb binding to a member of the integrin supergene family. *J. Immunol.* (In press).
- 157) Sasazuki T. et al. in *Leucocyte typing III-White cell differentiation antigens* (ed. McMichael A.J.) 223-225. (Oxford University Press, 1987).
- 158) Kramer R.H. & Marks N.-1989- Identification of integrin collagen receptor on human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 264 : 4684-8.

- 159) Wayner E.A. & Carter W.G.-1987- Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique α and common β subunits. *J. Cell. Biol.* 105 : 1873-84.
- 160) Pytela R., Pierschbacher M.D. & Ruoslahti E.-1985- Identification and isolation of a 140 kd surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell.* 40 : 191-8.
- 161) Sonnenberg A., Modderman P.W. & Hogervorst F.-1988- Laminin receptor on platelet is the integrin VLA-6. *Nature.* 360 : 487-9.
- 162) Hemler M.E., Crouse C. & Sonnenberg A.-1989- Association of the VLA α_6 subunit with a novel protein : possible alternative to the common VLA β_1 subunit on certain cell lines. *J. Biol. Chem.* 264 : 6529-35.
- 163) Marlin S.D. & Springer T.A.-1987- Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *Cell.* 51 : 813-19.
- 164) Staunton D.E., Dustin M.L. & Springer T.A.-1989- Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature.* 339 : 61-4.
- 165) Wright S.D., Weitz J.I., Huang A.J., Levin S.M., Silverstein S.C. & Loike J.D.-1988- Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85 : 7734-8.
- 166) Kishimoto T.K., Larson R.S., Corbi A.L., Dustin T.A., Staunton D.E. & Springer T.A.-1989- The leucocyte integrins. *Adv. Immunol.* 46 : 149-82.
- 167) Phillips D.R., Charo I.F., Parise L. & Fitzgerald L.A.-1988- The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood.* 71 : 831-43.
- 168) Cherest D.A. & Spiro R.C.-1987- Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen and Von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 262 : 17703-11.
- 169) Cherest D.A., Smith J.W., Cooper H.M. & Quaranta V.-1989- A novel vitronectin receptor integrin ($\alpha^V\beta_X$) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. *Cell.* 57 : 59-69.
- 170) Murrack P. & Kappler J.-1990- The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science.* 248 : 705-11.
- 172) Todd J.K., Fishaut M., Kapral F. & Welch T.-1978- Toxic-shock syndrome associated with phage-group I staphylococci. *Lancet* ii : 1116-1119.

- 173) Melish M.E. & Glasgow L.A.-1970-The staphylococcal scalded-skin syndrome. Development of an experimental model. N. Engl. J. Med. 282 : 1114-1121.
- 174) Cone L.A., Woodard D.R., Schlievert G.S. & Tomory G.S.-1987-Clinical and bacteriologic observations of a toxic shock-like syndrome due to *Streptococcus pyogenes*. N. Engl. J. Med. 317 : 146-52.
- 175) Kim Y.B. & Watson D.W.-1970-A purified group A streptococcal pyrogenic exotoxin. Physicochemical and biological properties including the enhancement of susceptibility to endotoxin lethal shock. J. Exp. Med. 131 : 611-23.
- 176) Claesson L., Larhammar D., Rask L. & Peterson P.A.-1983-cDNA clone for the human invariant γ chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80 : 7395-7406.
- 177) Kvist S., Wiman K., Claesson L., Peterson P.A. & Doberstein B.-1982-Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. Cell. 29 : 61-73.
- 178) Babbitt B., Allen P., Matsueda G., Haber E. & Unanue E.-1985-Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. Nature 317 : 359-379
- 179) Fraser J.D. -1989-High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. Nature 339 : 221.
- 180) Fisher H., Dohlsten M., Lindvall H.O., Sjogren H.O. & Carlsson R.-1989-Binding of staphylococcal enterotoxin A to HLA-DR on B cell lines. J. Immunol. 142 : 3153-
- 181) Uchiyama T. , Tadakuma T., Imanishi K., Araake M., Saito S., Yan X., Fujikawa H., Igarashi H. & Yamaura N. -1989-Activation of murine T cells by toxic shock syndrome toxin-1. The toxin-binding structures expressed on murine accessory cells are MHC class II molecules. J. Immunol. 143 : 3175-
- 182) Scholl P.R. , Diez A., Karr R., Sekaly R.P., Trowsdale J. & Geha R.S. - 1990-Effect of isotypes and allelic polymorphism on the binding of staphylococcal exotoxins to MHC class II molecules. J. Immunol. 144 : 226-
- 183) Fleischer B. -1989-Bacterial toxins as probes for the T-cell antigen receptor. Immunol. Today 10 : 262-
- 184) Fast D.J., Schlievert R.D. & Nelson R.D.-1989-Toxic shock syndrome-associated Staphylococcal and Streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. Infect. Immun. 57 : 291-

- 185) Fleischer B. & Schrezenmeier H.-1988- T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex Class II molecules on accessory or target cells. *J. Exp. Med.* 167 : 1697-
- 186) Kappler J., Kotzin B., Herron L., Gelfand E.W., Bigler R.D., Boylston A., Carrel S., Posnett D.N., Choi Y. & Marrack P. -1989-V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 244 : 811-
- 187) Choi Y., Kotzin B., Herron L., Callahan J., Marrack P. & Kappler J. -1989- Interaction of Staphylococcal aureus toxin "superantigens" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86 : 8941-
- 188) Festenstein H.-1973-Immunogenetic and biological aspects of in vitro lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplant. Rev.* 15 : 62-
- 189) Marrack P. & Kappler J.-1988-T cells can distinguish between allogenic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature.* 332 : 840
- 190) Marrack P., Kushnir E. & Kappler J.-1991- A maternally inherited superantigen encoded by a mammary tumour virus. *Nature.* 349 : 524-6.
- 191) Frankel W.N., Rudy C., Coffin J.M. & Huber B.T.-1991- Linkage of Mls genes to endogenous mammary tumour viruses of inbred mice. *Nature.* 349 : 526-7.
- 192) Woodland D.L., Happ M.P., Gollop K.J. & Palmer E.-1991- An endogenous retrovirus mediated deletion of $\alpha\beta$ T cells. *Nature.* 349 : 529-30.
- 193) Dyson P.J., Lnight A.M., Fairchild S., Simpson E. & Tomonari K.-1991- Genes encoding ligands for deletion of V β 11 T cells cosegregate with mammary tumour virus genomes. *Nature.* 349. 531-2.
- 194) Hügin A.W., Vacchio M. & Morse H.C.-1991- A virus-encoded "superantigen" in a retrovirus-induced immunodeficiency syndrome of mice. *Science.* 252 : 425-7.
- 195) Kawabe Y. & Ochi A.-1991- Programed cell death and extrathymic reduction of V β 8⁺ CD4⁺ T cells in mice tolerant to Staphylococcus aureus enterotoxin B. *Nature* 349 : 245-7.
- 197) Savill J., Dransfield I., Hogg N. & Haslett C.-1990- Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343 : 170-3.
- 198) Willie A.H.-1980- Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 284 : 555-6.

- 199) Willie A.H. & Morris R.G.-1982- Hormone-induced cell death : purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am; J. Pathol.* 6 : 78-87.
- 200) Smith C.A., Williams G.T., Kingston R., Jenkinson E.J. & Owen J.T.-1989- Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic culture. *Nature.* 337 : 181-4
- 201) Kappler J.W. , Wade T., White J., Kushnir E., Blackman M., Bill J., Roehm N. & Marrack P. -1987-*Cell* 49 : 263-71.
- 202) McDonald H.R., Schneider R., Lees R.K., Howe R.C., Acha-Orbea H., Festenstein H., Zinkernagel R.M. & Hentgartner H.-1988-T-cell receptor V β use predicts reactivity and tolerance to Mls^a-encoded antigens. *Nature* 332 : 40-5.
- 203) Sellins K.S. & Cohen J.J.-1987-Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.* 139 : 3199-3206.
- 204) McConkey D.J., Hartzell P., Amador-Perez J.F., Orrenius S; & Jondal M.-1989- Calcium-dependant killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.* 143 : 1801-6.
- 205) Shi Y., Sahai B.M. & Green D.R.-1989-Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridoma ad thymocytes. *Nature.* 339 : 625-6.
- 206) Jenkinson E.J., Kingston R., Smith C.A., Williams G.T. & Owen J.J.-1989- Antigen-induced apoptosis in developing T cells : a mechanism for negative selection of the T cell receptor repertoire. *Eur. J. Immunol.* 19 : 2175-7.
- 207) Murphy K.M., Heimberger A.B.& Loh D.Y.-1990- Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺ TCR^{lo} thymocytes *in vivo*. *Science.* 250 : 1720-23.
- 208) McConkey D.J., Hartzell P., Chow S.C., Orrenius S. and M. Jondal. 1990. Interleukine 1 inhibits T cell receptor-mediated apoptosis in immature thymocytes. *J. Biol. Chem.* 265 : 3009-3011.
- 209) Mc Conkey D.J., Orrenius S. & Jondal M.-1990- Agents that elevate cAMP stimulate stimulate DNA fragmentation in thymocytes. *J. Immunol.* 145 : 1227-30.
- 210) McConkey D.J., Orrenius S. & Jondal M.-1990- Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today.* 11 : 120-121.
- 211) Lorenz R.G.& Allen P.M.-1989-Thymic cortical epithelial cells lack full capacity for antigen presentation. *Nature* 340 : 557-9.

- 212) Swat W., Ignatowicz L., von Boehmer H. & Kisielow P.-1990- Clonal deletion of immature CD4⁺8⁺ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature*. 351 : 150-3
- 214) Liu Y.J., Joshua D.E., Williams G.T., Smith C.A., Gordon J. & McLennan I.C.-1989- Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature*. 342 ; 929-31
- 215) Banchereau J., de Paoli P., Vallé A., Garcia E. & Rousset F.-1991- Long term human B cell lines dependant on interleukine 4 and anti CD40. *Science*. 251 : 70-3.
- 216) Rousset F., Garcia E. & Banchereau J.-1991- Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *J. Exp. Med.* 173 : 705-10.
- 217) Metcalf D.-1989- The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haematopoietic cells. *Nature*. 339 : 27-30.
- 218) Duke R.C. & Cohen J.J.-1986- IL-2 addiction : withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependant T cells. *Lymphokine Res.* 5 : 289-99.
- 219) Williams L.R., Smith C.A., Spooncer E., Dexter T.M. & Taylor D.R.-1990- Haematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature* 343 : 76-9.
- 220) Vaux D.L., Cory S. & Adams J.M.-1988- Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335 : 440-2.
- 221) Strasser A. Harris A.W., Bath M.L. & Cory S.-1990- Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature*. 348 : 331-3.
- 222) Nunez G., London L., Hockenbery D., Alexander M., McKearn J.P. & Korsmeyer S.J.-1990- Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.* 144 : 3602-10.
- 223) Duke R.C., Chervanek R. & Cohen J.J.-1983- Endogenous endonuclease-induced DNA fragmentation : an early event in cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 : 6361-5.
- 224) Landon C., Nowicki M., Sugawara S. & Dennert G.-1990- Differential effects of protein synthesis inhibition on CTL and targets in cell mediated cytotoxicity. *Cell. Immunol.* 128 : 412-26.

- 225) Wong G.H., Elwell J.H., Oberley L.W. & Goeddel D.V.-1989-Manganous supreoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58 : 923-31.
- 226) Goldstein P., Ojcius D.M. & Young D.E.-1991-Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol. Rev.* 121 : 29-65.
- 227) Trauth B.C., Klas C., Peters A.M., Matzku S., Möller P., Falk W., Debatin K.M. & Krammer P.H.-1989- Monoclonal-antibody-mediated tumor rejection by induction of apoptosis. *Science* 245 : 301-5.
- 228) Debatin K.M., Goldmann C.K., Bamford R., Waldmann T.A. & Krammer P.H.-1990- Monoclonal antibody-mediated apoptosis in adult T cell leukemia. *The lancet.* 335 : 497-500.
- 229) Newell M.K., Haughn L.J., Maroun C.R. & Julius M.H.-1990- Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature.* 347 : 286-288.
- 230) Liu Y. & Janeway Jr C.A.-1990-Interferon g plays a critical role in induced cell death of effector T cell : a possible third mechanism of self-tolerance. *J. Exp. Med.* 172 : 1735-9.
- 231) Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. & Coffman R.L.-1986- Two type of murine T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136 : 2348-53.
- 232) Jenkins M.K., Pardoll D.M., Mizugushi J., Quill H. & Schwartz R.H.-1987- T-cell unresponsiveness in vivo and in vitro: fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95 : 113-133.
- 233) Russel J.H., White C., Loh D.Y. & Meleedy-Rey P.-1991- Receptor-stimulated death is opened in mature T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 2151-5.
- 234) Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., & Montagnier L.-1983- Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220 : 868-72.
- 235) Gallo R.C., Sarin P.S., Gelmann E.P. et al. -1983- Isolation of human T-cell leukemia-lymphomia syndrome (AIDS). *Science.* 20 : 865-7-9.
- 236) Levy J.A., Hoffman A.D., Kramer S.L., Shimabukoro J. & Oshiro L.S.-1984- Isolation of lymphocyto[^]pathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.-1984- *Science* 225 : 840-2.
- 237) Bendinelli M.& Ceccherini-Nelly L.-1988- Mechanisms of retrovirus pathogenicity. *Clin. Immunol.* 9 : 57-66.

- 238) Gardner M.B. & Luciw P.A.-1989- Animal models of AIDS. *Faseb J.* 3 : 2593-9.
- 239) Rabson A.B. & Martin M.A.-1985-Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* 40 : 477.
- 240) Cullen B.R. & Greene W.C.-1989- Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 58 : 423-
- 241) Hammes S.R., Dixon E.P., Malim M.H., Cullen B.R. & Greene W.C.-1989-Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 : evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 9549-53.
- 242) Sattentau Q.J. & Weiss R.A.-1988- The CD4 antigen : physiological ligand and HIV receptor. *Cell.* 52 : 631-5.
- 243) Klatzman D., Barre-Sinoussi F., Nugeyre M.T. et al. -1984- Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science.* 225 : 59-
- 244) Sattentau Q.J., Dalgleish A.G., Weiss R.A. & Beverley P.C.-1986- Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science.* 234 : 1120-
- 245) Gowda S., Stein B.S., Mohagheghpour N., Benike C.J. & Englemen E.G.-1989- Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4⁺ lymphocytes. *J. Immunol.* 142 : 773-80.
- 246) Shaw G.M., Hahn B.H., Arya S.K., Groopman J.E., Gallo R.C. & Wong-Staal F.-1984-Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome. *Science* 226 : 1165-
- 247) Fauci A.S.-1988- The human immunodeficiency virus : infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science.* 239 : 617-22.
- 248) Meltzer M.S., Skillman D.R., Hoover D.L., Hanson B.D., Turpin J.A., Kalter D.C. & Gendelman H.E.-1990- Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol. Today.* 11 : 217-23.
- 249) Folks T.M., Kessler S.W., Orenstein J.M., Justement J.S., Jaffe E.S. & Fauci A.S.-1988- Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal human bone marrow. *Sciences* 243 : 919-22.
- 250) Montagnier L., Gruest L.J., Chamaret S., Dauguet C., Axler C., Guetard C., Nugeyre T. Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Brunt J.B., Klatzmann D. & Gluckman J.C.-1984- Adaptation of lymphadenopathy-associated-virus (LAV) to replication in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines. *Science.* 225 : 63-6.

- 251) Monte D., Groux H., Raharinivo B., Plouvier B., Clavel T., Grangette C., Torpier G., Auriault C., Capron A. & Ameisen J.C.-1991- Productive HIV-1 infection of megacaryocytic cells is enhanced by tumor necrosis factor α . Blood (submitted).
- 252) Sakagushi M., Sato T. & Groopman J.E.-1991- Human immunodeficiency virus infection of megacaryocytic cells. Blood? 77 : 481-90.
- 253) D. Zaguri, Bernard J., Leonard R., Cheynier R., Feldman M., Sarin P.S. & Gallo R.C.-1986- Long-term cultures of HTLV-III infected T cells: A model of cytopathology of T cell depletion in AIDS. Science. 231 : 850-3.
- 254) Terai C., Kornbluth R.S., Pauza C.D., Richman D.D. and Carson D.A.-1991-Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured lymphoblasts acutely infected with HIV-1. J. Clin. Invest. 87, 1710-1715.
- 255) Talle M.A., Rao P.E., Westberg E., Allegar N., Makowski M., Mittler R.S. & Goldstein G.-1983- Pattern of antigenic expression of human monocytes as defined by monoclonal antibodies. Cell immunol. 78 : 83
- 256) Stewart S.J., Fujimoto J., Levy R.-1986-Human T lymphocytes and monocytes bear the same Leu-3 (T4) antigen. J. Immunol. 136 : 3773
- 257) DeRossi A., Franchini G., Aldovini A., Del Mistro A., Chieco-Bianchi L., Gallo R.C. & Wong-Staal F.-1986-Differential response to the cytopathic effects of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III) superinfection in T4⁺ (helper) and T8⁺ (suppressor) T-cell clones transformed by HTLV-I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 4297
- 258) Sodroski J., Goh W.C., Rosen C., Campbell K. & Haseltine W.A.-1986- Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. Nature 322 : 470.
- 259) Hoxie J.A. et al. -1986-Alteration in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. Science. 234 : 1123.
- 259) Gartner S., Markovits P., Markovitz D.M., Kaplan M.H., Gallo R.C. & Popovic M.-1986- The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. Science. 233 : 215-9.
- 260) Koenig S., Gendelman H.E., Orenstein J.M., Dal Canto M.C., Pezeshkpour G.H., Yungbluth M., Janotta F., Aksamit A., Martin M.A. & Fauci A.S.-1986- Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. Science. 233 : 1089-93.
- 261) Harper M.E., Marselle L.M., Gallo R.C. & Wong-Staal. -1986- Detection of lymphocytes expressing HTLV-III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83 : 772-6.

- 262) Schnittman S.M., Psallidopoulos M.C., Lane H.C. et al. -1989-The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a cell that maintains expression of CD4. *Science* 245 : 305-8.
- 263) Schnittman S.M., Denning S.M., Greenhouse J.J., Justement J.S., Baseler M., Kurtzberg J., Haynes B.J. & Fauci A.S.-1990- Evidence for susceptibility of intrathymic T-cell precursors and their progeny carrying T-cell antigen receptor phenotypes TCR $\alpha\beta$ ⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ to human immunodeficiency virus infection: A mechanism for CD4⁺ (T4) lymphocyte depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 7727-31.
- 264) Lyerly H.K., Matthews T.J., Langlois A.J., Bolognesi D.P. & Weinhold K.J.-1987- Human T-cell lymphotropic virus III β glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 4601-5.)
- 265) Siliciano R.F., Lawton T., Knall C., Karr R.W., Berman P., Gregory T. & Reinherz E.L.-1988- Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 clones : effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4⁺ cell depletion. *Cell.* 54 : 561-75.
- 266) Pedersen C., Dickmeiss E., Gaub J., Ryder L.P., Platz P., Lindhardt B.O. & Lundgren J.D.-1990- T-cell subset alterations and lymphocyte responsiveness to mitogens and antigen during severe primary infection with HIV : a case series of seven consecutive HIV seroconverters. *AIDS.* 4 : 523-6.
- 267) Hofmann B., Jakobsen K.D., Odum N., Dickmeiss E., Platz P., Ryder L.P., Petersen C., Mathiesen L., Bygbjerg I., Faber V. & Svejgaard A.-1989- HIV-induced immunodeficiency *J. Immunol.* 142 : 1874-80.
- 268) Miedema F., Petit A.J.C., Terpstra F.G., Schattenkerk J.K., De Wolf F., Al B.J., Roos M., Lange J., Danner S., Goudsmit J. & Schellekens P.T.-1988- Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. *J. Clin. Invest.* 82 : 1908-14. 269
- 269) Gurley R.J., Ikeuchi K., Byrn R.A., Anderson K. & Groopman J.E.-1989- CD4⁺ lymphocyte function with early human immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 1993-7.
- 270) Danner S., Goudsmit J. & Schellekens P.T.-1988- Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. *J. Clin. Invest.* 82 : 1908-14.
- 271) Weimer R., Schweighoffer T., Schimpf K. & Opelz G.-1989- Helper and suppressor T-cell function in HIV-infected hemophilia patients. *Blood.* 74 : 298-302.

- 272) Giorgi J., Fahey J., Smith D., Hultin L., Cheng H., Mitsuyasu R. & Detels R.-1986- Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* 138 : 3725-30.
- 273) Teeuwssen V.J.P., Siebelink K.H., De Wolf F., Goudsmit J., Uytdehaag F.G. & Osterhaus A.D.-1990-Impairment of in vitro immune response occurs within 3 months after HIV-1 seroconversion. *AIDS.* 4 : 77-81
- 274) Hofmann B., Odum N., Jakobsen B., Platz P., Ryder L. Nielsen J., Gerstoft J. & Svejgaard A.-1986- Immunological studies in the acquired immunodeficiency syndrome. *Scand. J. Immunol.* 23 : 669-78.
- 275) Cunningham-Rundles S., Michelis M. & Masur H.-1983- Serum suppression of lymphocyte activation in vitro in acquired immunodeficiency disease. *J. Clin. Invest.* 3 : 156-65.
- 276) Wood G.S., Burns B.F., Dorfman R.F. & Warnke R.A.-1986- In situ quantification of lymph node helper, suppressor, and cytotoxic T cell subsets in AIDS. *Blood.* 67 : 596-603.
- 277) Edelman A.S. & Zolla-Pazner S.-1989- Aids : a syndrome of immune dysregulation, dysfunction and deficiency. *Faseb J.* 3 : 22-30.
- 278) Dorsett B., Cronin W., Chuma V. & Ioachim H.L.-1985- Anti-lymphocyte antibodies in patients with the acquired immune deficiency syndrom. *Am. J. Med.* 78 : 621-6.
- 279) Kopelman R.G., Zolla-Pazner S.-1988- Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am. J. Med.* 84 : 82-8.
- 280) Morris L., Distenfeld A., Amorosi E. & Karpatkin S.-1982- Autoimmune thrombocytopenic purpura in homosexual men. *Ann. Int. Med.* 96 : 714-7.
- 281) Golding H., Shearer G.M., Hillman K., Lucas P., Manischewitz J., Zajac R.A., Clerici M., Gress R.E., Boswell R.N. & Golding B.-1989- Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV) 1-gp41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV &-infected individuals. *J. Clin. Invest.* 83 : 1430-5.
- 282) Via C.S., Morse III H.C. & Shearer G.M.-1990- Altered immunoregulation and autoimmune aspects of HIV infection : relevant murine models. *Immunol. Today* 11 : 250-5.
- 283) Miedema F., Tersmette M. & Van Lier R.-1990- AIDS pathogenesis : a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today* 11 : 293-7.

- 284) Van Noesel C.J., Gruters R.A., Terpstra F.G., Schellekens P.T., Van Lier R.A. & Miedema F.-1990- Functional and phenotypic evidence for a selective loss of memory T cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men. *J. Clin. Invest.* 86 : 293-9.
- 285) Gruters R.A., Terpstra F.G., De jong R., Van Noesel C.J.M., Van Lier R.A.W. & Miedema F.-1990- Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection. *Eur. J. Immunol.* 20 : 1039-44.
- 286) Tedder T.F., Clement L.T. & Cooper M.D.-1985-Human lymphocyte differentiation antigens HB-10 and HB-11.I. Ontogeny of antigen expression. *J. Immunol.* 134 : 2983-88.
- 287) Garbrecht F.C., Siskind G.W. & Weksler M.E.-1987- Lymphocyte transformation induced by autologous cells : XVIII. Impaired autologous mixed lymphocyte reaction in subjects with AIDS-related complex. *Clin. Exp. Immunol.* 67 : 245-53.
- 288) Vuillier F., Lapresle C. & Dighiero G.-1988- Comparative analysis of CD4-4B4 and CD4-2H4 lymphocyte subpopulation in HIV negative homosexual, HIV seropositive and healthy subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 71 : 8-15.
- 289) Gupta S.-1987- Subpopulations of CD4⁺ homosexual/bisexual men with persistent generalized lymphadenopathy. *Clin. Exp. Immunol.* 68 : 1-7.
- 290) Shearer G.M., Bernstein D.C., Tung K.S.K. et al. -1986-A model for the selective loss of MHC self-restricted T cell immune responses during the development of AIDS. *J. Immunol.* 137, 2514-2521.
- 291) Clerici M., Stocks N.I., Zajac R.A., Boswell R.N., Bernstein D.C., Mann D.L., Shearer G.M. & Berzofsky J.A.-1989- Interleukine 2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 339 : 383-5.
- 292) Hammarskjold M. & Rekosh D.-1989- *Biochem Biophys Acta.* 989 : 269-80.
- 293) Schneider J., Kaaden P., Copeland T.D., Oroszlan S. & Hunsmann G. -1986-Shedding and interspecies type sero-reactivity of the envelope glycopolypeptide gp120 of the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 67 : 2533-38.
- 294) Janeway C.A.-1988-The role of CD4 in T cell activation : accessory molecule or co-receptor ? *Immunol. Today* 10 : 234-238.
- 295) Banks I. & Chess L.-1985-Perturbation of the T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J. Exp. Med.* 162 : 1294.

- 296) Mann D.L., Lasane F., Popovic M., Arthur L.O., Robey W.G., Blattn W.A. & Newman N.J.-1987-HTLV-IIIB large envelope protein (gp120) supresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* 138 : 2640-4.
- 297) Shalaby M.R., Krowa J.F., Gregory T.J., Hirabayashi S.E., McCabe S.M., Kaufman D.S., Stites D.P. a Amann A.J. -1987-The effect of human immunodeficiency virus recombinant envelope glycoprotein on immune cell functions in vitro. *Cell. Immunol.* 110 : 140-8
- 298) Chirmule N., Kalyanaraman V.S., Oyaizu N., Slade H.B. & Pahwa S. - 1990- Inhibition of functional properties of tetanus antigen specific T cell clones by envelope glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus. *Blood* 75, 152-9.
- 299) Mittler R.S; & Hoffmann M.K.-1989- Synergism between HIV gp120 and gp120-specific antibody in blocking human T cell activation. *Science.* 245 : 1380-2.
- 300) Kornfelt H., Cruikshank W.W., Pyle S.W., Berman J.S. & Center D.M.- 1988- Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature.* 335 : 445-8.
- 301) Dreyer E.B., Kaiser P.K., Offermann J.T. & Lipton S.A.-1990- HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science.* 248 : 364-7.
- 302) Horak I.D., Popovic M., Horak E.M., Lucas P.J., Gress R.E., June C.H. & Bolen J.B.-1990- No T-cell tyrosine kinase signalling or calcium mobilization after CD4 association with HIV-1 gp120. *Nature .* 348 : 557-60.
- 303) Frankel A.D. & Pabo C.O.-1988-Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55 : 1189-
- 304) Viscidi R.P., Mayur K., Lederman H. & Frankel A.D.-1989- Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by tat protein from HIV-1. *Science.* 246 : 1606-8.
- 305) Mizuma H., Litwin S. & Zolla-Pazner S.-1988- B cell activation in HIV infection : relationship of spontaneous immunoglobulin secretion to various immunologic parameters. *Clin. Exp. Immunoil.* 71 : 410-6.
- 306) Gupta S. & Vayavegula B. -1987- *J. Clin. Immunol.* 7 : 486-9
- 307) Nye K.E. & Pinching A.J.-1990-HIV infection of H9 lymphoblastoid cells chronically activates the inositol polyphosphate pthway. *AIDS.* 4 : 41-5
- 308) Linette G.P., Hartzman J;, Ledbetter J.A. & June C.H.-1988- HIV-1-infected T cells show a selective signaling defect after perturbation of CD3/antigen receptor. *Science.* 241 : 573-6

- 309) Ascher M.S. and Sheppard H.W.-1990- AIDS as immune system activation. II. The panergic immnesia hypothesis. J. AIDS 3, 177-191.
- 310) Ameisen J.C. and Capron A.-1991-T cell dysfunction and depletion in AIDS : the programmed cell death hypothesis. Immunol. Today 123,102-105.
- 311) Groux H., Monte D., Bourrez J.M., et al. -1991-C. R. Acad. Sci. Paris t. 312, Serie III p. 599-606.
- 312) Gougeon M.L., Olivier R., Garcia S, Guetard D., Dragic C., Dauguet C. a Montagnier L.-1991-Mise en evidence d'un processus d'engagement vers la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH. C. R. Acad. Sci., Paris, t. 312,, Serie III p. 529-537.
- 313) Ucker D.S., Ashwell J.D. and Nickas G. -1989- Activation-driven T-cell deatyh. 1. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. J. Immunol. 143, 3461-3469.
- 314) Odaka C., Kisaki H. and Tadakuma T.-1990-T-cell receotor-mediated DNA fragmentation and cell death in T-cell hybridoma. J. Immunol. 144, 2096-2101.



Résumé

L'activation du lymphocyte T est régulée par l'intermédiaire de ses molécules de surface. Certaines de ces molécules sont pluripotentes et servent aussi bien à l'adhésion qu'à l'activation de la cellule. Nous avons étudié trois d'entre-elles : la molécule CD59 qui semble être un deuxième ligand (avec la molécule CD58, LFA-3) pour la molécule CD2, la molécule CD44, un récepteur du homing humain impliqué dans les mécanismes de régulation de l'activation des lymphocytes T et la molécule VLA-4, une molécule de la famille des intégrines servant à fixer la fibronectine mais aussi la molécule de surface V-CAM et possédant un rôle de régulation de l'activation des lymphocytes T.

Si l'activation des lymphocytes T conduit le plus souvent à leur prolifération, une activation inadéquate peut entraîner leur mort par un mécanisme de suicide actif : l'apoptose. Nous avons étudié les mécanismes permettant d'entraîner cette mort cellulaire et nous avons pu mettre en évidence un mécanisme assez général dans le cas des lymphocytes T où une sécrétion d'IFN γ en l'absence de sécrétion d'IL2 sur une cellule activée entraîne la mort de cette dernière.

D'autre part, nous avons proposé que la réémergence inappropriée dans la population lymphocytaire T CD4⁺ adulte d'un programme de suicide cellulaire pourrait expliquer à la fois le dysfonctionnement précoce et la déplétion tardive des lymphocytes T CD4⁺ chez les sujets infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine. Nous montrons que la perte sélective de la capacité des lymphocytes T CD4⁺ de sujets infectés par le VIH à proliférer in vitro est due à l'induction par les stimuli de la mort des lymphocytes T CD4⁺. Ce processus de mort cellulaire présente toutes les caractéristiques de l'apoptose (nécessité d'une synthèse protéique et condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN).

Ces résultats suggèrent que le suicide des lymphocytes T CD4⁺ en réponse à l'activation pourrait aussi se produire in vitro et être responsable, indépendamment de tout effet cytopathogène du virus, de la réduction progressive du nombre de lymphocytes T CD4⁺ qui aboutit au SIDA.