

50376
1994
365

50376
1994
365

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECNIQUES DE
LILLE FLANDRES-ARTCIS

THESE DE DOCTORAT

Présentée à l'université de Lille I
pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la vie et de la santé
par

JERÔME ESTAQUIER

**PROPRIETES FONCTIONNELLES DES SITES DE
RECONNAISSANCE DES CELLULES T ET DES
CELLULES B: APPLICATION AUX PROTEINES NEF
ET GP120 DU VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE (VIH-1).**

Soutenue le 16 DECEMBRE 1994

Devant la Commission d'Examen:

Président: A. DHAINAUT

Directeur: A. CAPRON

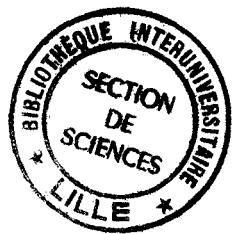
Rapporteurs: H. GRAS-MASSE
E. BAHRAOUI

Examinateurs: J.C. AMEISEN
C. AURIAULT

SCD LILLE 1



D 030 261044 3



A ma famille qui m'a offert tout au long de ces années son aide.

A Elisabeth qui partage au quotidien la vie d'un chercheur

In memoria

Germaine Estaquier, 1990.
Pierre Bréquigny, 1994.

Je tiens à remercier très vivement:

Monsieur le Professeur André Capron pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherche et permis d'effectuer cette thèse. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur Dhainaut pour me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Acceptez mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Bahraoui pour accepter de juger ce travail; thématique de travail qui fut un temps sienne. Merci.

Madame le Professeur Gras-Masse pour avoir été une des charnières de ce travail et avec qui j'ai pu partager tout au long de ces années mes premiers pas de chercheur. Qu'il me soit permis d'y associer le Professeur Tartar ainsi que Christophe Boutillon sans lesquels ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Monsieur le Docteur Auriault, plus qu'un patron tu as été un ami, avec qui j'ai partagé mes premiers pas, qui firent l'objet de très nombreuses discussions se finissant parfois fort tard au laboratoire; pardon Martine.

Monsieur le Docteur Ameisen pour toute son aide et sa disponibilité tout au long de ces années. C'est aujourd'hui au quotidien qu'il m'est possible de partager cette bonne humeur et ce savoir scientifique, heureux qu'il m'ait offert toute sa confiance.

Je tiens également à remercier bien d'autres personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement et à la concrétisation de ce travail:

A mes maîtres, au Professeur Nigon et au Professeur Revillard à l'université Claude Bernard à Lyon.

Un très grand merci à Elisabeth Gomard, Martine Peeters, et Eric Delaporte qui m'ont toujours gratifié de leur amitié et de leurs conseils; de même qu'à Isabelle Wolowczuk à qui cette thèse doit beaucoup.

A mes amis Lyonnais Annie, Claudine, Corinne, Laurent, Florent, Pascal, Philippe, Pierre, et Montillien Jean-François et Jean-Louis qui ont su par leur amitié me donner tout cet allant, et cette joie. Merci à vous tous.

Je souhaiterais remercier également mes amis Lillois Isabelle Ferru, Sandra Gianini, Isabelle Godard, Delphine Grezel, Nathalie Ivanoff, Dominique Zelus, Daniel Avital, Jean-Marc Bestian, Bertrand Georges, Thierry Idziorek, Laurent Martin, Lionel Zenner, et tous les autres...

Merci à Nadia Vandrome pour m'avoir aidé dans la rédaction de cette thèse.

50376
1994
365

50376
1994¹
365

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS

THESE DE DOCTORAT
Présentée à l'université de Lille I
pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la vie et de la santé
par
JERÔME ESTAQUIER

**PROPRIETES FONCTIONNELLES DES SITES
DE RECONNAISSANCE DES CELLULES T
ET DES CELLULES B: APPLICATION AUX
PROTEINES NEF ET GP120 DU VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH-1).**

Soutenue le 16 DECEMBRE 1994

Devant la Commission d'Examen

Président: A. DHAINAUT

Directeur: A. CAPRON

Rapporteurs: H. GRAS-MASSE
E. BAHRAOUI

Examinateurs: J.C. AMEISEN
C. AURIAULT

SOMMAIRE

| | |
|--------------------------------------------------|-----------|
| I) ABREVIATIONS | 8 |
| II) AVANT PROPOS | 9 |
| III) SCHEMA GENERAL DE LA REONSE IMMUNE | 14 |
| 1) La cellule T | 17 |
| 1.1 Différenciation cellulaire | |
| 1.2 Le récepteur antigénique | |
| a) Le récepteur T | |
| b) Le récepteur Ti et son organisation génomique | |
| c) Le complexe CD3 | |
| d) Les molécules CD4 et CD8 | |
| 1.3 Les molécules accessoires | |
| a) La molécule CD45 | |
| b) La molécule CD2 | |
| c) La molécule CD28 | |
| d) La molécule LFA-1 | |
| 2) La cellule B | 29 |
| 2.1 Différenciation cellulaire | |
| 2.2 Les anticorps | |
| 2.3 Le récepteur antigénique | |
| 2.4 La molécule CD40 | |
| 3) Les cellules présentatrices | 37 |
| 3.1 Le récepteur antigénique | |
| a) Les molécules de classe I | |
| b) Les molécules de classe II | |
| 3.2 Les cellules dendritiques | |
| a) La cellule dendritique | |
| b) La cellule folliculaire dendritique | |
| c) La cellule de Langerhans | |
| 3.3 Les cellules B | |
| 3.4 Les cellules macrophagiques | |

| | |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4) Base moléculaire de la reconnaissance antigénique | 47 |
| 4.1 Liaison antigène-anticorps | |
| 4.2 Liaison antigène-molécule de CMH | |
| a) L'adressage moléculaire | |
| b) L'interaction moléculaire | |
| 4.3 La reconnaissance antigénique par le récepteur T | |
| 5) Mécanismes biochimiques de la transduction | 63 |
| 5.1 La voie de la phospholipase C | |
| a) Schéma général | |
| b) Les phospholipases C | |
| c) Les protéines kinases C | |
| d) L'inositol triphosphate et la réponse calcique | |
| 5.2 La voie de l'adénylate cyclase, les protéines G, et l'AMP cyclique | |
| a) Les protéines G | |
| b) L'adénylate cyclase | |
| c) l'AMP cyclique | |
| 5.3 Les phosphorylations protéiques | |
| 5.4 Conséquences géniques de l'activation cellulaire | |
| a) Les gènes immédiats | |
| b) Les gènes précoces | |
| c) Les gènes tardifs | |
| 6) Les Cytokines et leurs récepteurs | 72 |
| 6.1 Interleukine 2 | |
| 6.2 Interleukine 3 | |
| 6.3 Interleukine 4 | |
| 6.4 Interleukine 5 | |
| 6.5 Interleukine 9 | |
| 6.6 Interleukine 10 | |
| 6.7 Interleukine 12 | |
| 6.8 Interféron γ | |
| IV) LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) | 81 |
| 1) La nature du virus | 85 |
| 1.1 Infection et réPLICATION | |
| a) Absorption et pénétration | |
| b) Synthèse du provirus et intégration | |

| | |
|-------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.2 Structure et organisation génomique | |
| a) La particule virale | |
| b) La région LTR | |
| c) La glycoprotéine d'enveloppe | |
| d) La protéine tat | |
| e) La protéine rev | |
| f) La protéine nef | |
| g) La protéine vif | |
| h) La protéine vpu | |
| i) La protéine vpr | |
| 2) Physiopathologie de l'infection par VIH | 96 |
| 2.1 Immunopathologie | |
| a) L'infection par VIH | |
| b) Les virus apparentés | |
| 2.2 Les effets cytopathogènes | |
| a) Rôle direct du virus | |
| b) Mécanismes indirects | |
| 2.3 Dysfonctionnement des cellules CD4 | |
| a) Augmentation des cellules suppressives | |
| b) Réponses autoimmunes | |
| c) Signaux inhibiteurs fournis par les protéines virales | |
| d) Infection et destruction sélective des cellules mémoires | |
| e) Cytotropisme | |
| f) Apoptose ou mort cellulaire programmée | |
| g) TH1/TH2 | |

V) RESULTATS EXPERIMENTAUX **105**

Article 1: Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J.C., Gras-Masse H., Lecocq J.P., Barbier B., Dixson A., Tartar A., Capron A., and C. Auriault. 1992. **T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (HIV-1) nef protein in rats and chimpanzees.** Molec. Immunol. 29: 489-499.

Article 2: Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J.C., Gras-Masse H., Delanoy A., Lecocq J.P., Dixson A., Tartar A., Capron A., and C. Auriault. 1992. **Determination of B-cell epitopes of nef HIV-1 protein:**

Immunogenicity related to their structure. Molec. Immunol. 29: 1337-1345.

Article 3: Estaquier J., Boutillon C., Gras-Masse H., Ameisen J.C., Capron A., Tartar A. and C. Auriault. 1993. **Comprehensive delineation of antigenic and immunogenic properties of peptides derived from the nef HIV-1 regulatory protein.** Vaccine 11: 1083-1092.

Etude complémentaire: Estaquier J., Boutillon C., Gras-Masse H., Capron A., Tartar A., Auriault C. and J-C. Ameisen. **Etude du répertoire T vis-à-vis des protéines du virus de l'immunodéficience humaine VIH chez des sujets infectés.**

Discussion

Article 4: Estaquier J., Gras-Masse H., Boutillon C., Ameisen J-C., Capron A., Tartar A., and C. Auriault. **The mixotope: A combinatorial peptide library as a T- and B-cell immunogen.** Eur. J. Immunol. en cours de publication

Article 5: Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J-C., Tartar A., and C. Auriault. **Variability in the human immunodeficiency virus (HIV-1) V3 domain leads to distinct T helper cell responses.** J. Virol. En cours de préparation

Discussion

VI) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

171

VII) BIBLIOGRAPHIE

AUTRES PUBLICATIONS A COMITÉ DE LECTURE

(Non présentées dans cette thèse)

PUBLICATIONS ORIGINALES

- 1991-1 **Estaquier J.**, Peeters M., Bedjabaga L., Honoré C., Bussi P. Dixson A., and E. Delaporte. 1991. Prevalence and transmission of simian immunodeficiency virus and simian T-cell leukemia virus in a semi-free-range breeding colony of mandrills in Gabon. *AIDS*. 5: 1385-1387.
- 1994-2 **Estaquier J.**, Idziorek T., De Bels F., Barré-Sinoussi F., Hurtrel B., Aubertin A-M., Venet A., Methali M., Muchmore E., Michel P., Mouton Y., Girard M., and J.C. Ameisen. 1994. Programmed cell death and AIDS: the significance of T-cell apoptosis in pathogenic and non pathogenic primate models of chronic lentiviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 91: 9431-9435.
- 1994-3 Rouaix F., Gras-Masse H., Mazingue C., Ridel P., Diesis E., Marguerite M., **Estaquier J.**, Capron A., Tartar A., and C. Auriault. 1994. Improvement of the T cell response to a non immunogenic peptide by its tandem association with a highly efficient T helper peptide. *Immunopharmacol*. 28:137-143.
- 1994-4 Rouaix F., Gras-Masse H., Mazingue C., Diesis E., Ridel P., **Estaquier J.**, Capron A., Tartar A., and C. Auriault. 1994. Effect of a lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T cells. *Vaccine*. 12:1209-1214.
- 1994-5 Godard I., **Estaquier J.**, Zenner L., Bossus M., Auriault C., Darcy F., Gras-Masse H., and A. Capron. 1994. Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Molec. Immunol*. En cours de publication.

REVUES ET CHAPITRE DE LIVRES

- 1993-1 **Estaquier J.**, Wolowczuk I., Boutillon C., Gras-Masse H., Marguerite M., Bossus M., Tartar A., Capron A., and C. Auriault. 1993. Expected properties of synthetic peptide vaccines: Experimental approach with peptides derived from parasite (Sm28GST) and virus (nef) proteins. *Advances in Allergy and Immunol*. 2: 11-26.
- 1994-2 Ameisen J-C, **Estaquier J.**, Idziorek T., and F. De Bels. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and AIDS pathogenesis: an update.

- VIII Colloque des Cent Gardes. Retrovirus of human AIDS and related animal diseases.* M. Girard and L. Valette eds. pp. 5-10.
- 1994-3 **Estaquier J.** and J.C. Ameisen. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and AIDS: Is TH1 dysfunction and deletion related to an abortive TH1/TH2 switch process. "Challenges of Modern Medicine", Serono Symposia Publications (A.K. Abbas and S. Romagnani eds). En cours de publication.
- 1994-4 Ameisen J-C, **Estaquier J.**, Idziorek T., and F. De Bels. 1994. Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. *Programmed death of immune cells. Current Topics in Microbiology and Immunology*. En cours de publication.
- 1994-5 Ameisen J.C., **Estaquier J.**, Idziorek T., and F. DeBels. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and AIDS pathogenesis. In: Biotech 94, AIDS-from basic science to prevention diagnosis and therapy. (A. Albertini, ed Clas international). En cours de publication.

ABBREVIATIONS

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| AA | Acide aminé |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| AMPc | Adénosine monophosphate cyclique |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| Ag | Antigène |
| BCR | Récepteur spécifique des cellules B |
| BLV | Bovine Leukemia Virus |
| CAEV | Caprine Infectious Encephalitis Virus |
| CPAg | Cellule présentatrice d'antigène |
| FDC | Cellule folliculaire dendritique |
| FeLV | Feline Leukemia Virus |
| gp(s) | Glycoprotéine |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL- | Interleukines |
| kDa | kilo-Dalton |
| PKC | Protéine kinase C |
| PKA | Protéine kinase A |
| SIDA | Syndrome d'Immunodéficience acquise |
| SIV | Simian Immunodeficiency Virus |
| TCR | Récepteur spécifique des cellules T |
| VIH (HIV) | Virus de l'Immunodéficience Humaine |

AVANT PROPOS

*Conserver la santé et guérir les maladies: tel est le problème que la médecine a posé dès son origine et dont elle poursuit encore la solution scientifique**. Les maladies infectieuses ont été et sont toujours les compagnes fatales constantes de notre vie. Trois mille ans avant J.C., la médecine égyptienne attribuait à des vers les maladies infectieuses. On sait depuis que les maladies sont bien distinctes, attribuables à différents pathogènes: parasites, bactéries, virus...

La maladie infectieuse porte par conséquent les caractères de la vie; elle naît et meurt avec un destin et une continuité. Pour assurer cette perpétuité, elle nécessite à se modifier selon les circonstances. Une maladie infectieuse change et évolue sans cesse; la nature ayant pour complice le temps.

Elle peut prendre une forme inapparente non décelable en terme de pathologie mais néanmoins transmissible entre membres d'une même espèce et se conduire comme pathogène suite à un changement de niche écologique. Le changement est la loi de la vie, qu'il soit brusque ou lent, il a un rôle au cours de l'évolution.

Nous serons par conséquent toujours confrontés à des maladies nouvelles. En outre, nous ne saurons jamais les dépister dès leurs origines. Lorsqu'elles nous apparaîtront, elles seront déjà "formées" adultes.

En réponse, à ces agressions externes, envahisseurs étrangers ou corps exogènes de toute sorte, la nature s'est dotée de systèmes de défense. L'homme présente ainsi un ensemble de procédés dénommé "Système Immunitaire", assurant une protection à l'organisme. L'homme, le seul être à prendre une part active à son changement et à son évolution, a cherché à révéler cette structure organisée qui fait l'homme. Il a appris à prévenir ou à traiter un grand nombre de maladies et d'épidémies qui sévissaient dans le passé; il a réussi à transformer sa vie en exerçant un contrôle sur les facteurs extérieurs à son propre corps, responsables de ces fléaux.

* *Leçon d'ouverture du cours de médecine du Collège de France: Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, Claude Bernard, 1864.*

Ainsi, très tôt, de manière empirique, avant même les premières tentatives de prévention des maladies infectieuses par vaccination, l'homme a su percevoir le rôle de la contagion entre individus et par conséquent a su s'en protéger par des dispositions sanitaires fort simples (isolement et confinement, contrôle de la propreté, assainissement, ...). L'usage de la variolisation (inhalation de croûtes de pustules varioliques) est apparu au cours du X^{ème} siècle en Chine et représente la première tentative humaine de protection active. Toutefois, il faut attendre le début du XIII^{ème} siècle en Europe, sous l'impulsion de Lady Mary Wortley Montagu (1689-1762), pour voir l'introduction de la variolisation, et des premiers essais de vaccination par Edward Jenner (1749-1823). Le terme vaccination tire son nom du latin *vacca* (vache), vaches qu'utilisait E. Jenner pour produire le virus de la variole bovine dite vaccine utilisé pour protéger de la variole humaine.

Il faudra cependant attendre Louis Pasteur (1822-1895) pour voir la généralisation du concept de la vaccination. Elle lui a permis en très peu d'années de tirer au clair les applications pratiques pour le rouget du porc, le charbon, le choléra des poules et la rage.

Ainsi, naquit l'immunologie moderne, et de ces travaux le développement généralisé des vaccins. En 1884, Koch découvre le vibron cholérique et Ferran puis Haffkine, en 1892, tentent d'immuniser les sujets par des bacilles vivants. En 1896, Almroth Wright (1861-1947) expérimente chez l'homme le premier vaccin tué antithyphoïdique. En 1923, les premiers résultats de vaccination anticoquelucheuse furent rapportés par Robert Madsen; Gaston Ramon (1886-1963) découvre l'anatoxine diphtérique puis téstanique; Albert Calmette (1863-1933) et Camille Guérin (1873-1961) le B.C.G. En 1955, Jonas Salk publia les résultats du premier vaccin inactivé contre la poliomyélite et, en 1957, Albert Sabin administre ce même vaccin mais atténué par voie orale. Désormais, il en existe un très grand nombre à l'usage humain ou vétérinaire. Ils peuvent être regroupés en trois grandes catégories:

- les vaccins inactivés, à base de bactéries ou de virus entiers, dont on a inhibé l'infectivité par des traitements le plus souvent chimiques (Poliovirus-Salk, Rage, Encéphalites, Coqueluche, Choléra...).

- les vaccins vivants, à base de bactéries ou de virus infectieux, dont on a atténué la virulence par passages successifs jusqu'à l'obtention de souches avirulentes (Poliovirus-Sabin, Rougeole, Rubéole, Oreillons, Varicelle, Fièvre Jaune, Hépatite A, Tuberculose, Fièvre Typhoïde...).

- les vaccins dits "sous-unités", à base d'antigènes viraux ou bactériens, ou de toxines purifiées (Hépatite B, Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Méningocoques A et C, Pneumocoques...).

Or, voilà, la nature sans cesse évolue et l'être humain encore une fois est confronté à une nouvelle épidémie. Ce nouvel agent infectieux est le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), responsable du Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise ou SIDA. Il peut être l'illustre exemple de mes propos évoqués précédemment.

- L'apparition de symptômes cliniques de fréquences inhabituelles a conduit à la recherche et à la découverte de ce nouvel agent.
- Il existe une multitude de virus apparentés et ce, dans de nombreuses espèces animales.
- Quant au pouvoir pathogène de ce virus, il revêt plusieurs visages allant de la guerre ouverte au *modus vivendi* voire à la symbiose.

Depuis 1981, date de sa découverte jamais effort en matière de recherche vaccinale n'a été aussi important. Malheureusement, à ce jour, ces efforts sont restés vains et représentent un échec de la vaccination classique; cet échec résidant sans doute à une méconnaissance réelle des mécanismes de protection mis en jeux au cours de la vaccination. Aujourd'hui, nous voici cependant à l'aube d'une ère nouvelle, celle de la compréhension des mécanismes de pathogénèse et de protection, la clef du progrès résidant sans doute dans cette compréhension.

L'objet de cette thèse s'inscrivait, à l'époque où je l'ai entreprise, dans cette perspective de thérapie vaccinale, de type sous-unité et plus précisément sur l'utilisation de peptides synthétiques issus de protéines virales codées par le Virus de l'Immunodéficience Humaine.

L'abondance des données et de l'évolution rapide de nos connaissances tant sur le plan du système immunitaire que sur celui du virus de l'immunodéficience humaine, rendent difficile une tentative de synthèse bibliographique détaillée. Ce document vise par conséquent à proposer une synthèse compréhensible permettant d'appréhender les rouages moléculaires et cellulaires du système immunitaire.

Dans la première partie de cette thèse, sont abordées les notions de reconnaissance et de présentation antigénique.

Puis est présenté ce nouvel hôte ô combien déjà présent sur notre planète, non seulement chez l'Homme, *Homo sapiens sapiens*, mais également dans d'autres espèces pour lesquelles il ne présente pas ces caractères de pathogénèse.

La dernière partie est consacrée à la présentation de nos résultats relatant,

d'une part, l'identification et la caractérisation des sites antigéniques et immunogéniques de la protéine nef du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1), reconnus par les cellules B et les cellules T; d'autre part la caractérisation et l'amélioration du pouvoir immunogène de séquences synthétiques, en particulier basées sur l'utilisation de "librairie combinatoire" peptidique.

Ces résultats ne se veulent pas définitifs, bien des questions demeurent.

Jamais nous ne devons oublier que les faits dont nous nous occupons sont mouvants, qu'aucune formule ne peut les fixer, les définir, que nous n'en apercevons qu'un tronçon, que les commencements nous échappent, que le phénomène se modifie entre nos mains et, par conséquent, que ce que nous prononçons, ce que nous imprimons, n'est qu'une traduction maladroite, incomplète d'un aspect momentané, d'une seconde au cadran illimité du temps.

Charles Nicolle, 1939.

SCHEMA GENERAL DE LA REPONSE IMMUNITAIRE

Le système immunitaire s'est développé au cours de l'évolution pour nous protéger des multiples germes présents dans l'environnement. D'une façon générale, la réaction de l'organisme vis-à-vis d'un germe se traduit à la fois par une réponse non spécifique, dite naturelle ou innée, et d'une réponse spécifique. Classiquement, l'immunité est dite spécifique lorsqu'elle met en jeu des effecteurs capables de reconnaître les antigènes au niveau de déterminants antigéniques, conduisant à leur mémorisation.

Toutefois, si l'organisme ne disposait que de moyens de défense spécifiques, la latence nécessaire pour leur établissement en cas de primo-infection serait mise à profit par l'agent infectieux pour se multiplier et créer, avant toute action, des lésions irréversibles. Ces mécanismes de défense naturelle sont variés, allant des processus mécaniques, chimiques, à des mécanismes cellulaires (phagocytes, complément, interférons, ...) voire métaboliques comme la fièvre.

Les lymphocytes T et les lymphocytes B sont les représentants du système immunitaire capables de reconnaître spécifiquement les Ag. Ils disposent à ce titre de récepteurs membranaires constitués chacun schématiquement de deux composants distincts:

- Le premier composant est formé de protéines capables de reconnaître spécifiquement les structures étrangères grâce à un site spécialisé "paratope" capable de se combiner à un site "épitope" situé sur la molécule étrangère. La structure du "paratope" présente une hypervariabilité unique dans le monde des récepteurs membranaires. Cette hypervariabilité permet en théorie à ces protéines de reconnaître toute structure antigénique et de s'y associer. Le message de cette association est alors transmis au second composant.

- Le second composant est constitué d'un complexe protéique membranaire de structure conservée, dont la fonction est de transduire vers le cytoplasme et le noyau une série complexe de signaux biochimiques déclenchant la réponse cellulaire appropriée.

Ces unités forment ce que l'on appelle le complexe du récepteur T à l'antigène (TCR) et le complexe du récepteur B à l'antigène ou complexe de l'immunoglobuline membranaire (mIg).

Leurs interactions avec l'antigène entraînent d'une part l'activation et la prolifération des lymphocytes T-auxiliaires et T cytotoxiques, et d'autre part, l'activation et la prolifération des lymphocytes B; ces derniers se différenciant en plasmocytes sécrétors d'anticorps. L'émission de nombreuses cytokines et les contacts cellulaires assurent la coordination de ces réponses, les lymphocytes T-

auxiliaires jouant un rôle clé dans cette partition .

Cette défense spécifique serait toutefois impossible sans l'intervention d'un élément essentiel qui repose sur la façon dont ces cellules perçoivent l'antigène. En effet, alors que les lymphocytes B reconnaissent les déterminants antigéniques portés par les antigènes, sous formes solubles, présents dans leur environnement, les lymphocytes T ont besoin de la collaboration de cellules accessoires qui vont leur présenter des fragments "prédigérés" et ce, en association avec une troisième structure réceptrice, elle-même spécifique et extrêmement variable. Il s'agit des molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II. Ces cellules dites de présentation de l'antigène (CPA), ou plus exactement de fragments antigéniques, sont les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules interdigitées, les lymphocytes B, et dans certaines conditions, toute cellule nucléée de l'organisme.

LA CELLULE T

1.1 DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Les cellules T des mammifères se différencient dans un organe bien défini, le thymus. La fonction thymique décroît avec l'âge de sorte que cet organe apparaît superflu chez l'adulte. La thymectomie adulte n'affecte pas les fonctions immunitaires. Les cellules pénétrant dans le thymus néonatal ne semblent pas être particulièrement prédestinées à devenir des cellules T matures. Leurs marqueurs membranaires et intracellulaires sont apparentés à ceux des cellules pré-B ne présentant aucun réarrangement des gènes du récepteur T. C'est donc l'environnement thymique lui-même qui donne à ces cellules le signal de différenciation vers la lignée. Au sein du thymus, on distingue différentes sous-populations de thymocytes qui peuvent être distinguées en fonction de leurs marqueurs de surface. La différenciation cellulaire au cours du passage dans le thymus s'accompagne d'une prolifération et d'une mort cellulaire considérables (Scollay et Shortman, 1985).

Les précurseurs des lymphocytes T migrent dans le thymus où ils subissent une série d'étapes de différenciation qui correspondent à l'acquisition ou à la perte d'antigènes de membrane qui sont aujourd'hui assez bien caractérisés (Von Boehmer, 1992; Sprent, 1990; Egerton *et al.*, 1990). Les premières cellules, dites prothymocytes, issues de la moelle osseuse, présentent à leur surface la molécule CD7 et au niveau du cytoplasme la molécule CD3. Elles migrent ensuite dans le cortex thymique où elles acquièrent les antigènes CD1, CD2, CD5, CD25 (la chaîne α du récepteur de l'interleukine 2, dénommé aussi Tac), et surtout les molécules CD4 et CD8; les cellules immatures étant de ce fait doublement positives ($CD4^+CD8^+$). En migrant dans la médullaire thymique, les thymocytes expriment en surface la molécule CD3 mais perdent la molécule CD1. A ce stade, ils acquièrent aussi le récepteur T pour l'antigène (TCR) et subissent ce que l'on appelle la "sélection thymique", c'est à dire l'élimination des cellules autoréactives capables de réagir contre des cellules du soi ainsi que des cellules considérées comme "inefficaces". Ce processus vise à éliminer les cellules dangereuses pouvant entraîner la destruction des cellules de notre propre organisme (maladies auto-immunes). On estime ainsi que seules 15% des cellules T survivent aux processus de sélection. Les cellules T se séparent ensuite en deux populations principales présentant à leur surface soit l'antigène CD4, soit

l'antigène CD8 (cellules matures simples positives). Elles migrent alors dans le compartiment périphérique où elles perdent la molécule CD25 mais acquièrent la molécule CD28 (Sprent, 1993).

* Les lymphocytes CD8⁺ présentent deux fonctions distinctes:

- d'une part une fonction cytotoxique, c'est à dire la destruction des cellules présentant à leur surface des antigènes différents du "soi", telles que des cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus et qui expriment donc des antigènes viraux à leur surface. Ces antigènes, en général des molécules endogènes, sont présentés aux cellules CD8⁺ en association avec la molécule de CMH de classe I,

- d'autre part une fonction suppressive.

* Les lymphocytes CD4⁺, dits "auxiliaires" (helper), jouent un rôle de "chef d'orchestre" dans la réponse immunitaire - aussi bien humorale que cellulaire - par l'intermédiaire d'interactions cellulaires directes ou via des médiateurs solubles ou cytokines. Par la reconnaissance de l'antigène présenté par les cellules présentatrices telles que les macrophages ou les lymphocytes B, ils assurent la réponse spécifique. Leur activation conduit à la sécrétion de facteurs solubles nécessaires à la stimulation des autres cellules immunocompétentes et le déroulement de la réponse immunitaire. Deux sous populations lymphocytaires T dénommées TH1 et TH2 ont été ainsi définies sur la base de sécrétion différente de cytokines.

1.2 LE RECEPTEUR ANTIGÉNIQUE

Les cellules T auxiliaires comme les cellules T cytotoxiques sont capables de reconnaître de manière très spécifique un antigène et ce malgré un répertoire capable d'en reconnaître un très grand nombre. Jusqu'en 1984 avec les premiers travaux de Hedrich S. *et al.*, et de Yanagi Y. *et al.*, la compréhension de la structure du récepteur T ainsi que les mécanismes qui permettaient cette diversité sont demeurés obscures, contrairement à ceux du récepteur des cellules B identifiés depuis 1970.

En 1987, dans le cadre du CES d'Immunologie à Lyon, j'abordais la structure et les mécanismes de reconnaissance des cellules T par la rédaction d'un mémoire intitulé: "*Structure génomique et mécanisme de réarrangement impliqués dans la constitution du récepteur T (Ti) murin et humain; comparaison*

aux immunoglobulines". Or, depuis ce travail, bien des notions sont apparues permettant ainsi de définir des sous populations T dites $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ (Brenner *et al.*, 1988), ainsi que le rôle joué par ces différentes chaînes α et β dans leur capacité à interagir avec l'antigène, de même que les domaines qui les composent.

a) *Le récepteur T:*

Le récepteur est formé par un complexe multiprotéique associant un "hétérodimère" (Ti) porteur de la spécificité antigénique et une structure invariante CD3, elle-même composée de cinq protéines (γ, δ, ϵ , le doublet $\zeta\zeta$ ou $\zeta\eta$) (Clever *et al.*, 1988; Weiss, 1990, 1991). Ce premier ensemble est plus communément dénommé récepteur T (TCR). Les molécules CD4 et CD8 interviennent comme co-récepteurs dans la reconnaissance. Les molécules CD4 et CD8 reconnaissent plus spécifiquement les produits des gènes codant pour les molécules du "complexe majeur d'histocompatibilité" (CMH) respectivement de classe II et de classe I. Chacune de ces molécules, nécessaires à la transduction optimale du signal, est couplée à des enzymes. Le récepteur T (TCR) est associé à la tyrosine kinase p59fyn quant aux molécules CD4 et CD8, elles sont associées à la tyrosine kinase p56lck (Ledbetter *et al.*, 1993).

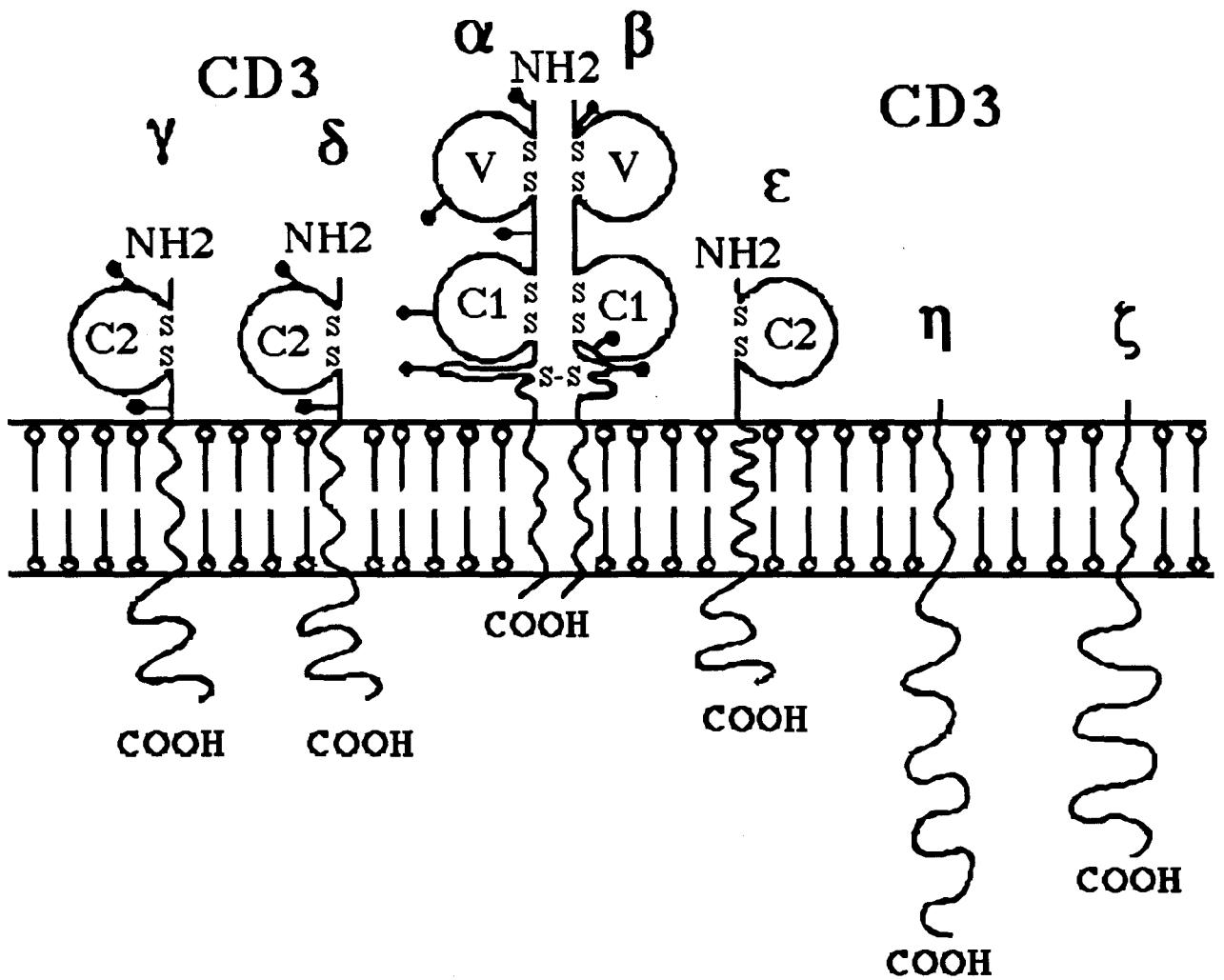
Si la majorité des lymphocytes T est porteuse d'un récepteur T $\alpha\beta$, le second récepteur formé des chaînes $\gamma\delta$ ne représente qu'une faible proportion des lymphocytes T, sans toutefois exprimer les marqueurs CD4 ou CD8. Ces derniers représentent 1 à 3% des cellules spléniques ou ganglionnaires mais sont la population T dominante au sein de la peau, des muqueuses intestinales et bronchiques (Haas *et al.*, 1993; Havran et Boismenu, 1994).

b) *La molécule Ti et son organisation génomique*

La molécule Ti ($\alpha\beta$) s'apparente aux immunoglobulines (Davis et Bjorkman, 1988; Ashwell et Klausner, 1990). Les domaines N-terminaux des deux chaînes α et β forment le site de reconnaissance antigénique (paratope), (Matis, 1990). On trouve en outre un domaine constant, suivi d'un segment hydrophobe et d'une région intracytoplasmique.

La diversité nécessaire à cette reconnaissance est générée par l'utilisation de différents segments de gènes non contigus dénommés respectivement Variable (V), Jointif (J), Diversité (D) et Constant (C). Ainsi, l'organisation génomique du récepteur T s'apparente à celle des immunoglobulines décrite ultérieurement (Davis, 1990; Mak, 1988).

TCR



LE COMPLEXE CD3/TCR

La chaîne β : Les gènes codant pour la chaîne β sont localisés sur le chromosome 7 chez l'homme et 6 chez la souris. On estime aujourd'hui à une trentaine les segments $V\beta$ chez l'homme et à plus d'une centaine ceux chez la souris. En aval de ces gènes $V\beta$, on retrouve deux ensembles identiques de gènes, formés d'un segment $D\beta$ associé à six gènes $J\beta$ et à un gène $C\beta$. A proximité de ces différentes séquences génomiques, on trouve un segment hautement conservé de type heptamérique suivi d'une séquence variable dénommée espaceur constituée de vingt-trois ou douze nucléotides suivi d'une séquence nonamérique riche en bases A/T. Ces signaux sont utilisés comme sites de recombinaisons. Le mécanisme utilisé pour le réarrangement est celui de la formation d'une boucle et de son excision permettant le rapprochement des différents segments VDJ .

La chaîne α : Son organisation génomique quoique apparentée à la chaîne β en est toutefois bien distincte. Il existe un très grand nombre de gènes $V\alpha$, plus d'une centaine, ainsi qu'un très grand nombre de gènes $J\alpha$ mais il n'existe pas de gènes $D\alpha$. En outre, au sein du locus de la chaîne α , des gènes codant pour la chaîne δ du récepteur Ti y sont retrouvés. Elle est codée par le chromosome 14 chez la souris et chez l'homme.

Deux principaux mécanismes permettent de créer la diversité $\alpha\beta$. Ils s'appuient d'une part sur la recombinaison des différents segments $V\beta D\beta J\beta$ et $V\alpha J\alpha$ et d'autre part sur la jonction plus ou moins précise entre ces différents segments constituant des régions dites N (Clevers et Owen, 1991).

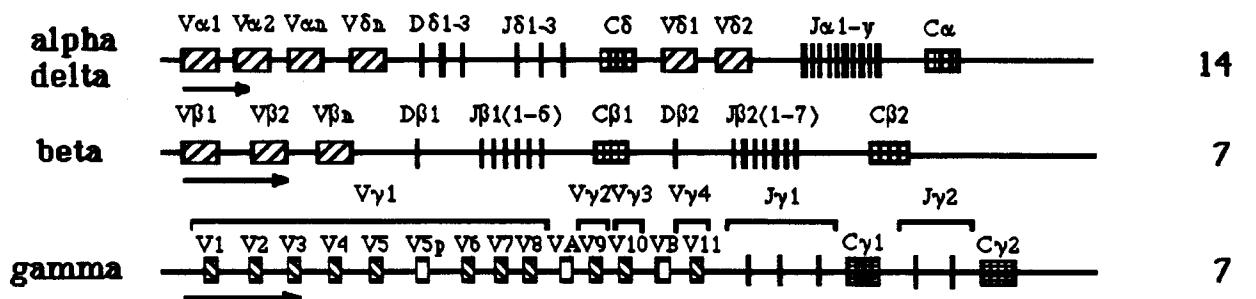
Le second récepteur formé des chaînes $\gamma\delta$ s'apparente au récepteur $\alpha\beta$ et aux immunoglobulines dans leur organisation génomique; chacun des gènes étant subdivisible en segments variables et constants (Allison et Havran, 1991; Moller, 1991).

La chaîne γ : La chaîne γ est codée par un ensemble de gènes situés respectivement sur les chromosomes 13 chez la souris et 7 chez l'homme. Chez la souris, il existe 7 gènes $V\gamma$ et $J\gamma$ dont un pseudogène et quatre domaines constants.

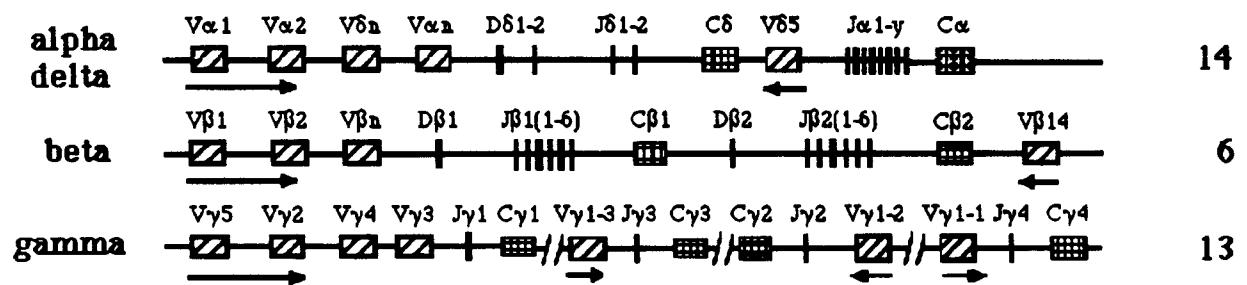
La chaîne δ : Chez la souris et chez l'homme elle est codée par le chromosome 14 et présente de grandes similitudes. Chez la souris, il existe un gène $C\delta$, deux gènes $J\delta$, deux gènes $D\delta$ et une huitaine de gènes $V\delta$ qui sont susceptibles d'être utilisés. On peut difficilement les mettre en évidence car ils se trouvent localisés parmi les gènes $V\alpha$. D'autre part, certains gènes $V\alpha$ sont également utilisés lors du réarrangement génomique.

TCR Humain

Chromosomes



TCR Murin



Organisation génomique codant pour les récepteurs T
αβ et γδ

c) La molécule CD3

Il s'agit d'un des tous premiers marqueurs lymphocytaires T identifiés à l'aide d'anticorps monoclonaux. Initialement décrite comme étant une chaîne polypeptidique unique, il s'est avéré que cette molécule est formée d'au moins trois autres protéines qui co-précipitent avec le récepteur T, établissant ainsi que le complexe CD3 fait partie intégrante de ce dernier.

Deux formes co-existent avec le récepteur T (Malissen et Schmitt-Vermulst, 1993; Wegener *et al.*, 1992), selon l'appariement des différentes protéines, définies respectivement par les complexes protéiques $\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2-\alpha\beta$ et $\gamma\delta\epsilon_2\zeta\eta-\alpha\beta$. Chez l'homme, les molécules CD3 γ et δ sont des glycoprotéines respectivement de 25 KDa et 20 KDa tandis que les molécules CD3 ϵ et ζ sont des protéines non glycosylées de 19 KDa et 16 KDa. Chez la souris, quoique équivalentes, ces protéines ont des poids moléculaires différents de 21, 28, 25 et 16 KDa (Baniyash *et al.*, 1988; Alarcon *et al.*, 1991). Quant à la chaîne η son poids moléculaire est de 22 KDa (Jin *et al.*, 1990).

L'étude de la séquence en acides aminés des trois protéines $\gamma\delta$ et ϵ montre de fortes homologies ce qui suggère l'existence possible d'un gène ancestral pour ces trois protéines. En outre, comme pour le récepteur T, elles présentent dans le domaine extracellulaire de grandes similitudes de structure avec celle des immunoglobulines.

La chaîne ζ existe soit sous la forme d'un homodimère relié par un pont dissulfure soit, dans 10 à 20% des cas, sous la forme d'un hétérodimère avec la chaîne η reliée également par un pont dissulfure. Cette protéine ζ est toutefois bien différente des trois précédentes. Elle présente un domaine extracellulaire réduit de 9 acides aminés dont la cystéine nécessaire à la formation du pont dissulfure, un domaine intracellulaire contenant des séquences concensus de fixation pour l'ATP ainsi que de nombreuses tyrosines dont la phosphorylation conduit à une augmentation considérable de son poids moléculaire, passant de 16 à 21 KDa. Quant à la chaîne η , celle-ci est bien moins connue.

Au cours du développement, le complexe CD3 est exprimé très précocément. Sa constitution incomplète est largement instable et s'avère dès lors dégradée dans la cellule. Au cours de cette constitution, l'homodimère ζ_2 est capable de s'associer aux chaînes α et β du TCR et ce, en l'absence des trois autres protéines γ , δ et ϵ . Par précipitation, la chaîne γ s'apparie à la chaîne β du TCR tandis que la chaîne ϵ de la molécule CD3 s'apparie aux deux chaînes. La reconnaissance par les anticorps anti-CD3 de la protéine ϵ entraîne une activation

cellulaire T, transduite par la protéine p59fyn, à laquelle elle est associée (Letourneur et Klausner, 1992).

d) Les molécules CD4 et CD8

Ces molécules font partie de la superfamille des immunoglobulines. Le gène codant pour ces protéines est localisé sur le chromosome 12 chez l'homme et est divisé en 9 exons (Littman, 1987; Parnes, 1989). Chaque exon code pour un domaine distinct à l'exception du premier domaine et du domaine cytoplasmique. L'ARNm de la molécule CD4 code pour une protéine précurseur comportant un peptide signal hydrophobe de 25 acides aminés qui est clivé pour donner une molécule de 433 acides aminés d'un poids moléculaire de 55kDa. Les deux domaines extracellulaires de la molécule CD4 ont été caractérisés par cristallographie au rayon X. Le premier domaine présente 7 feuillets β antiparallèles dont deux qui conduisent à la protrusion de la face latérale de la molécule impliquée dans la fixation au CMH.

La molécule CD8, quant à elle, ne possède qu'un seul domaine apparenté aux immunoglobulines, suivi d'un domaine dont la structure demeure encore inconnue. Cependant, elle possède des résidus cystéine lui permettant de former un homodimère.

Les molécules CD4 comme les molécules CD8 sont impliquées dans la fixation aux molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité respectivement de classe II et de classe I (Konig *et al.*, 1992). Plus précisément, la molécule CD4 interagit avec les régions de classe II proximales de la membrane qui sont relativement invariantes. La molécule CD8 interagit au niveau du troisième domaine de la chaîne α des molécules de classe I, ce qui laisse à penser que cette molécule est sous une forme allongée. Au cours de l'activation T, les molécules CD4 et CD8 se trouvent être physiquement liées au récepteur T (Janeway, 1992; Saizawa *et al.*, 1987).

On trouve associé à ces deux molécules, deux tyrosines Kinases p56lck et p59fyn (Barber *et al.*, 1989; Veillette *et al.*, 1988; Glaichenhaus *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1992). La p56lck fait partie de la famille des protéines Src. Elle est située sur la face interne de la membrane des lymphocytes T grâce à sa séquence N-terminale myristillée. Elle se fixe à la région intracytoplasmique de la molécule CD4 par ses 32 acides aminés N-terminaux de façon non covalente.

Si de nombreux arguments telle que l'agrégation du CD4 par des anticorps spécifiques laissent à penser que cette protéine joue un rôle majeur dans la

transduction du signal, il semble qu'elle ne soit pas la seule à être impliquée.

1.3 LES MOLECULES ACCESSOIRES

L'activation cellulaire T nécessite, pour être optimale et efficace, la participation d'autres molécules exprimées à la surface cellulaire (Springer, 1990; Jenkins et Johnson, 1993; Janeway et Goldstein, 1993).

a) La molécule CD45

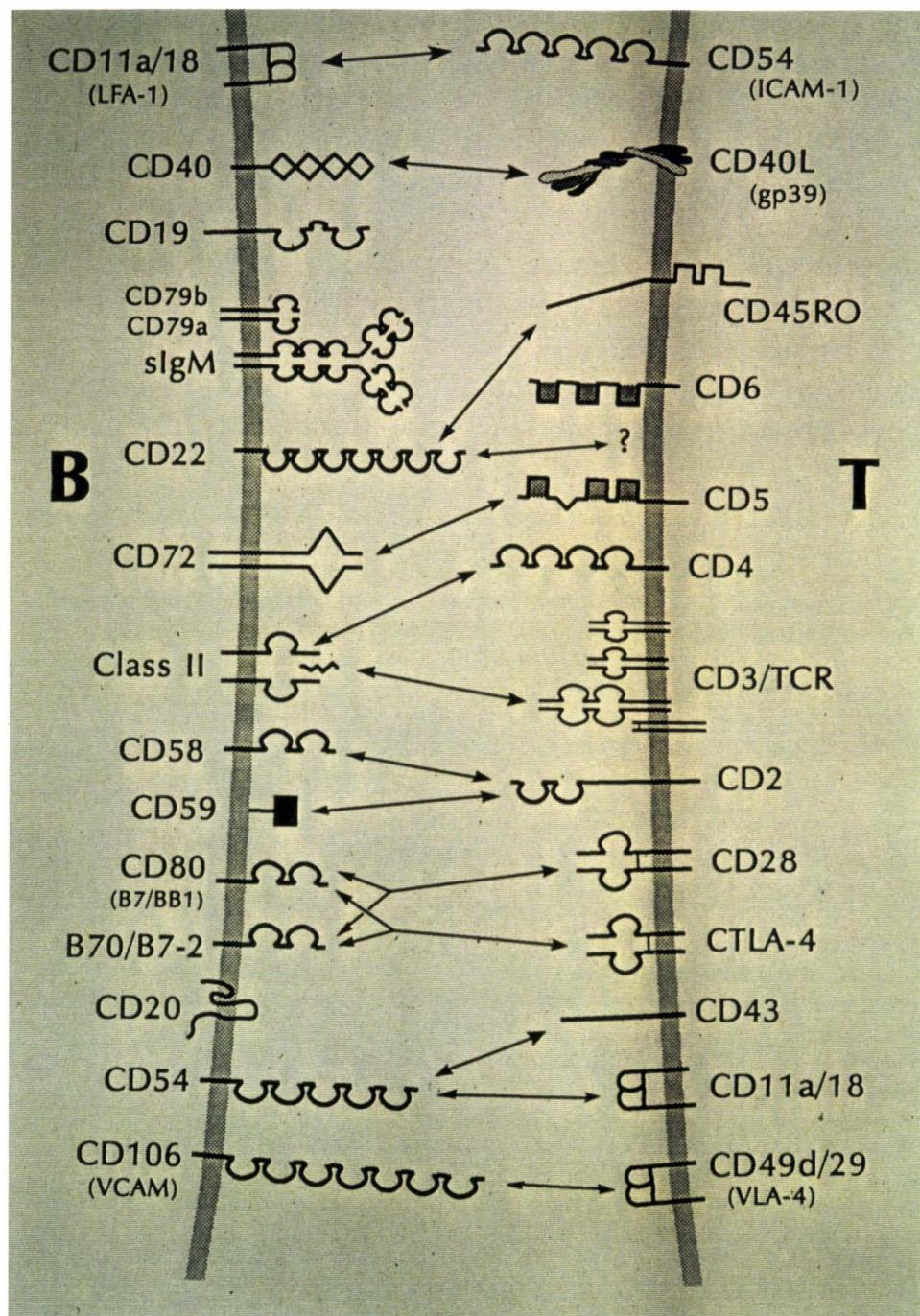
Cette molécule est retrouvée sur l'ensemble des cellules d'origine hématopoïétique (McKay, 1993). Elle présente un domaine extracellulaire variable et une région cytoplasmique constante possédant deux domaines tyrosine phosphatases en tandem (Thomas, 1989).

Différentes isoformes de cette molécule existent, dont l'expression semble être modifiée au cours de l'activation. Cette variabilité d'expression provient d'un épissage alternatif du transcrit du gène CD45. Tandis que les cellules T naïves expriment les isoformes de haut poids moléculaire (CD45RA), l'expression des isoformes de faible poids moléculaire CD45RO identifie les populations T mémoire et T activés. Les anticorps UCHL1, 2H4 et C393.16A reconnaissent respectivement les formes dites CD45RO, CD45RA et CD45RB (Michie *et al.*, 1992; Bell, 1992; Bradley *et al.*, 1993). Ainsi, la molécule CD45 est non seulement indispensable à l'activation T mais de plus, elle participe directement à la transduction de ce signal.

Le ligand de la molécule CD45 est la protéine CD22 associée au récepteur antigénique des cellules B (Stamenkovic *et al.*, 1991), participant à l'activation de cette cellule B (Leprince *et al.*, 1993; Schulte *et al.*, 1992; Aruffo *et al.*, 1992).

b) La molécule CD2

Les cellules T possèdent la propriété de se fixer aux globules rouges de mouton pour former des rosettes E (pour Erythrocytes). L'utilisation d'anticorps monoclonaux a permis d'identifier un récepteur dénommé CD2 (Seed et Aruffo, 1987). Il s'agit d'une glycoprotéine de 50 KDa, exprimée sur les lymphocytes T, les thymocytes et les cellules cytotoxiques dites "Natural Killer" NK. Elle est constituée d'une seule chaîne "monomorphique" comportant deux domaines externes analogues aux domaines des immunoglobulines, un domaine



MOLECULES ACCESSOIRES PARTICIPANT A L'INTERACTION CELLULAIRE DES CELLULES B ET T

transmembranaire et une importante portion cytoplasmique (Bierer et Hahn, 1993). Elle apparaît très tôt au cours de la maturation thymique et démontre une remarquable conservation structurale entre espèces. Son expression sur les cellules T, tant du point de vue quantitatif que qualitatif (changement de conformation), est différente selon qu'il s'agisse de cellules T au repos ou de cellules T activées. Comme de nombreux autres systèmes d'activation, la transmission d'un signal d'activation nécessite la formation de complexes multimoléculaires (Bierer *et al.*, 1989; Beyers *et al.*, 1993).

Le ligand de la molécule CD2 est la protéine LFA-3 (CD58) (Makgoba *et al.*, 1989), exprimée à la surface des cellules endothéliales, des fibroblastes ou des cellules présentatrices.

c) La molécule CD28

La molécule CD28 est l'une des molécules accessoires jouant un rôle prépondérant dans la "costimulation" cellulaire T (Schwartz, 1992; June *et al.*, 1990). Il s'agit d'un homodimère de 44 kDa, initialement dénommé T44 ou Tp44. Elle est exprimée au niveau du sang périphérique sur environ 95% des cellules CD4⁺ et 50% des cellules CD8⁺. Au niveau du thymus, elle est exprimée faiblement sur les thymocytes immatures CD3⁻ ou doubles positifs CD4⁺CD8⁺. Lors de leur maturation en cellules thymiques matures, simples positives, se produit une augmentation de l'expression de la molécule CD28 à la surface cellulaire.

Au niveau de clones CD4⁺, la densité d'expression de molécule CD28 a permis de distinguer deux sous populations:

- les premiers présentant une faible expression, sécrètent de l'interleukine 2, de l'interféron γ et du TNF α et possèdent une activité cytotoxique.
- les seconds présentant une plus forte expression de cette protéine produisent peu de lymphokines et n'ont pas d'activité cytotoxique.

Au niveau des populations CD8⁺, deux sous populations ont pu être également distinguées:

- l'une exprimant la molécule CD28 et ayant une activité dite "cytotoxique""
- l'autre ne l'exprimant pas, ou faiblement, et montrant une activité suppressive.

Le traitement des cellules T par des anticorps anti CD28 modifie leur comportement en réponse à une stimulation par des mitogènes ou à des anticorps dirigés vis-à-vis du complexe TCR/CD3. Ainsi, outre la prolifération, la sécrétion d'interleukine 2 s'en trouve être augmentée par son action inhibitrice sur la dégradation et la stabilisation des ARNm et ce, seulement après 6 heures d'activation. Cet effet sur l'activation cellulaire T est résistant à des agents immunosuppresseurs comme la ciclosporine, certaines prostaglandines ou la vitamine D3.

Le ligand de la molécule CD28 est la molécule B7 (CD80) exprimée à la surface des cellules présentatrices. Différentes formes de la molécule B7 existent. La molécule CTLA-4 présente une grande homologie avec la molécule CD28 et conduit à une activation des cellules T (Linsley *et al.*, 1992; Allison, 1994).

d) La molécule LFA-1

La molécule LFA-1 (Leucocyte Function-associated Antigen-1) est une intégrine (protéine d'adhésion) qui joue un rôle crucial dans l'adhésion de nombreux leucocytes (Martz, 1987; Hogg, 1989; Springer, 1990). Cette molécule est formée d'un hétérodimère ($\alpha 1\beta 1$), lié de manière non covalente. Les chaînes α et β sont respectivement désignées par CD11a et CD18, chacune ayant un poids moléculaire de 180 KDa et 95 KDa, lorsqu'elles sont glycosylées. Le ligand de la molécule LFA-1 est la molécule ICAM-1 (CD54) exprimée sur de nombreux tissus.

In vitro, l'utilisation d'anticorps anti-LFA-1 inhibe la prolifération et la sécrétion d'interleukine 2 par des cellules T préalablement activées. L'adhésion des lymphocytes par l'intermédiaire de la molécule LFA-1 est magnésium dépendante à la différence de bien d'autres intégrines qui sont calcium dépendantes. En outre, elle se trouve être inhibée par la cytochalasine ou lorsque les cellules sont placées à 4°C.

Les anticorps anti-CD3 augmentent transitoirement l'expression de la molécule LFA-1 à la surface cellulaire de même que des esters de phorbol. Cette modulation d'expression est toutefois blocable par l'AMPc ou la Staurosporine.

LA CELLULE B

2.1 DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Les lymphocytes B sont d'abord produits au niveau du foie foetal, puis chez l'adulte, dans la moelle osseuse. Schématiquement, leur différenciation se réalise en plusieurs étapes (Klinman, 1994):

- La première étape est la différenciation vers la lignée B. Elle s'accompagne du réarrangement séquentiel des gènes codant pour la chaîne légère et la chaîne lourde des Immunoglobulines (Ig), ainsi que de l'expression des IgM de membrane représentant le récepteur initial pour l'antigène.

- Lors des étapes ultérieures, les cellules colonisent les organes lymphoïdes périphériques. Certaines de ces cellules B peuvent commuter pour produire des Ig de différentes classes et ce, sous l'influence de l'antigène et des signaux de différenciation et de prolifération provenant des cellules T et des cellules accessoires.

La rate représente l'organe prédominant de la circulation lymphocytaire comparée aux autres organes et est le réservoir des cellules B dans l'organisme (Kelsoe et Zheng, 1993). Les cellules B ont également été classées en différentes populations selon leur localisation dans les tissus lymphoïdes secondaires. Dans la rate par exemple, les cellules B des manchons lymphoïdes périartériolaires peuvent être divisées en sous populations: celles situées dans la zone marginale ne recirculent que très lentement, beaucoup plus sensibles au cyclophosphamide que les cellules B folliculaires. De plus, les cellules B de phénotype IgM^{hi}IgD^{hi} correspondent à des cellules migrantes tandis que celles ayant pour phénotype IgM^{hi}IgD^{lo} seraient plus sessiles. Cependant, ces observations ne seraient pas applicables aux cellules B humaines puisqu'on retrouve essentiellement des IgD^{hi}.

En outre, les cellules B peuvent être classifiées en cellules naïves et cellules mémoires. Les cellules B dites mémoires, ont fréquemment commuté leurs isotypes M et D en d'autres classes telles que A, E et G; cependant des cellules B d'isotype IgM peuvent également représenter des cellules mémoires (Honjo, 1983; Shimizu et Honjo, 1984).

Une des caractéristiques majeures et "princeps" des cellules B est la synthèse d'immunoglobulines, les unes membranaires (mIg), les autres sécrétées ou anticorps. Ainsi, les cellules B perçoivent et reconnaissent l'antigène grâce à ces molécules.

Tandis que les marqueurs CD19, CD20, CD21 ou CD22 sont spécifiques des cellules B, d'autres marqueurs sont associés à des états d'activation ou retrouvés sur d'autres populations cellulaires. En outre, de nombreuses molécules de surface peuvent être sur-exprimées suite à l'activation cellulaire. Tel est le cas, des molécules codées par le CMH de classe I et de classe II, le récepteur des IgE (Fc ϵ II ou CD23). Un des marqueurs intéressants des cellules B, porté également par les cellules T est le marqueur CD5 (Kipps, 1989). Cette molécule est supposée discriminer les cellules B sur leur capacité ou non à reconnaître le soi. Chez les rongeurs, elle ne représente qu'un faible pourcentage des cellules B adultes tandis qu'au stade foetal, elle représente 70% des cellules B et au stade néonatal 30%. La même observation peut être faite chez l'homme où l'on observe une diminution progressive de ces cellules au cours de la gestation pour ne représenter qu'au plus 8% des cellules B chez l'adulte.

2.2 LES ANTICORPS

Les anticorps sont les molécules de reconnaissance produites par les cellules B. Ils ont une grande hétérogénéité mais présentent une structure de base commune associant deux chaînes polypeptides lourdes (H: heavy chain) et deux chaînes légères κ et λ (L: light chain), reliées par des ponts dissulfures intercaténaires et des liaisons non covalentes. Ainsi, les chaînes des immunoglobulines sont codées par trois loci distincts (Engler et Storb, 1988; Pascual et Capra, 1991; Schatz *et al.* 1992).

Ces différentes chaînes se composent de plusieurs domaines globulaires. Les domaines N-terminaux des chaînes légères et lourdes forment le site de reconnaissance antigénique ou paratope. Ces domaines sont très variables, restreints à certaines régions impliquées directement dans la capacité à interagir avec l'antigène, permettant ainsi de reconnaître toute molécule. Outre ces domaines variables, les immunoglobulines présentent des domaines dits constants (moins variables) dont certains prennent part dans l'interaction entre les anticorps et le récepteur pour les immunoglobulines. Cette dualité reflète l'organisation génomique des anticorps: les domaines variables et les domaines constants sont codés par des exons séparés, secondairement réunis à la suite d'événements de recombinaison de l'ADN et d'épissage de l'ARN. Le locus de la chaîne lourde est ainsi formé de quatre ensembles distincts de gènes dénommés comme pour le récepteur T: V (Variable), D (Diversité), J (Jointif), C (Constant) impliquant deux réarrangements successifs du DNA, DJ puis VDJ. Les séquences situées



STRUCTURE TRIDIMENTIONNELLE DES IMMUNOGLOBULINES (Type IgG)

entre J et C étant éliminées au niveau de la traduction (RNA); enfin un deuxième réarrangement au niveau du DNA peut survenir, il est appelé commutation isotypique conduisant aux différentes classes et sous-classes des immunoglobulines.

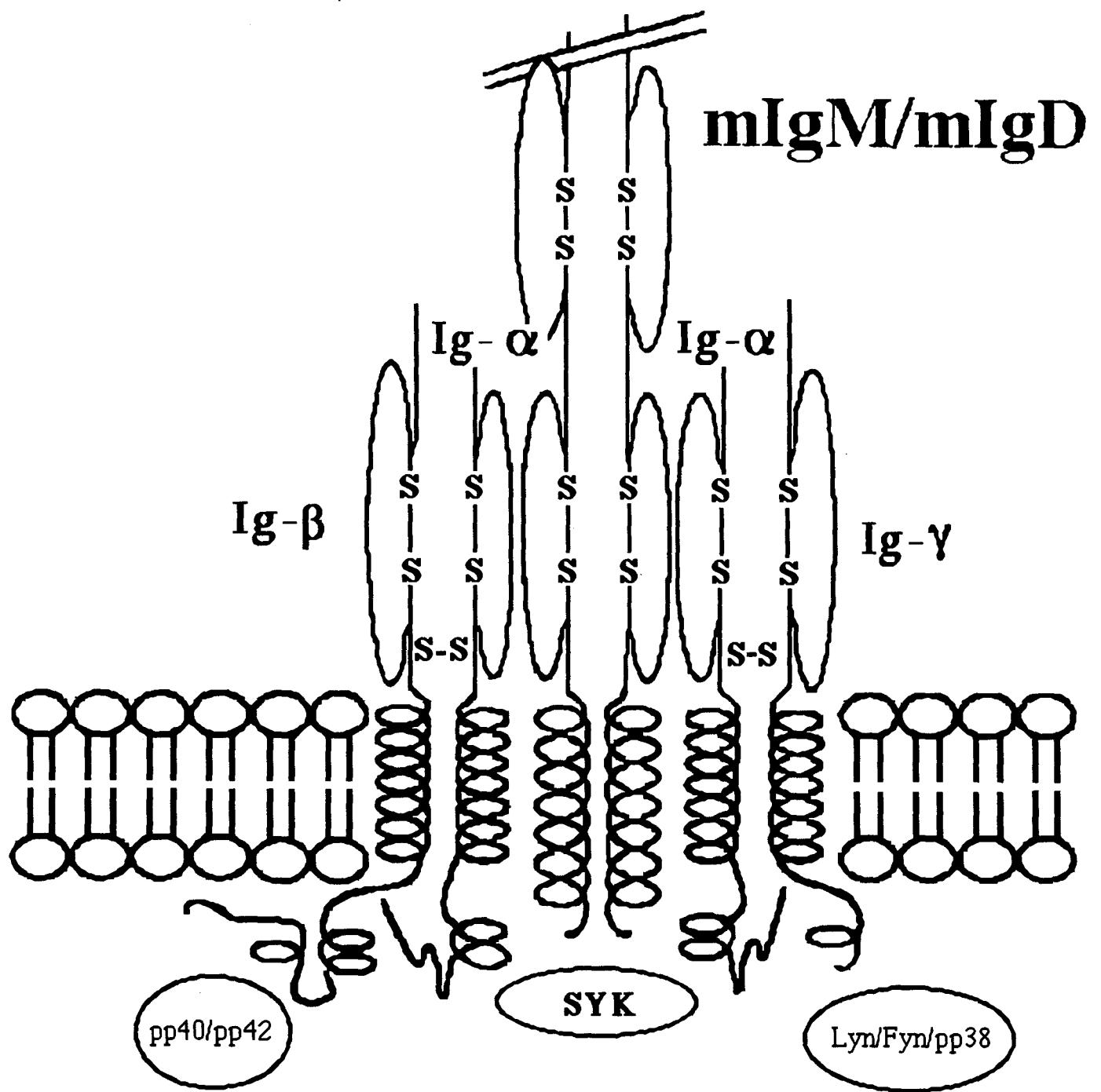
Ainsi, les anticorps se répartissent en plusieurs classes et sous-classes selon le type de chaîne lourde qu'ils présentent (Shimizu et Honjo, 1984). Chez l'homme, on définit ainsi neuf classes différentes d'immunoglobulines: les IgM, les IgG1, les IgG2, les IgG3, les IgG4, les IgA1, les IgA2, les IgD, et les IgE.

Le mécanisme par lequel les cellules B commutent leur IgM/IgD de surface en IgA, IgE et une des quatre IgG est sous l'influence de certaines cytokines qui seront présentées ultérieurement. Citons dès à présent le rôle majeur de l'IL-4 dans la production d'IgE et d'IgG1 inhibée par l'IFN γ qui, quant à lui, induit préférentiellement l'IgG2a et l'IgG3, enfin le TGF β et IL-5 impliqués dans la production d'IgA (Snapper et Mond, 1993).

2.3 LE RECEPTEUR ANTIGENIQUE

Les cellules B perçoivent l'antigène dans leur environnement par l'intermédiaire des immunoglobulines fixées dans la membrane cellulaire (mIg). (Moeller, 1993; Cambier *et al.*, 1993; Reth, 1994). Quoique apparentées aux immunoglobulines qui sont sécrétées, les mIg possèdent dans leur partie C-terminale, un domaine transmembranaire et cytoplasmique; ce dernier étant constitué seulement de 3 acides aminés dans le cas des IgM et IgD de membrane. Malgré un domaine cytoplasmique réduit, la liaison bivalente des mIg conduit à une activation cellulaire, une endocytose du récepteur, une dégradation antigénique, et finalement la prolifération et la différenciation de la cellule B. Ce récepteur est composé d'une structure de reconnaissance antigénique, à laquelle est associée, de façon non covalente, une seconde structure permettant la transduction des signaux, composée de plusieurs protéines (Ig α , β , γ) (Sanchez *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1992; Sakaguchi *et al.*, 1993), et de plusieurs enzymes cytoplasmiques effectrices appartenant à la famille des Src-tyrosine kinases (Lyn, Fyn, Blk et Syk kinase) (Malek et Desiderio, 1993) L'activation de ces kinases conduit à une rapide phosphorylation des résidus tyrosine, et de nombreux substrats telles que la protéine d'activation de la protéine p21ras (p21rasGAPase), des protéines p190 et p62, des phospholipases C γ 1 et C γ 2 MAP kinase.

L'analyse biochimique des protéines transductrices Ig- α (32/33 kDa), Ig β (37kDa) et Ig γ (34kDa) révèle que ces protéines sont des hétérodimères liés par



Modèle structural du récepteur des cellules B

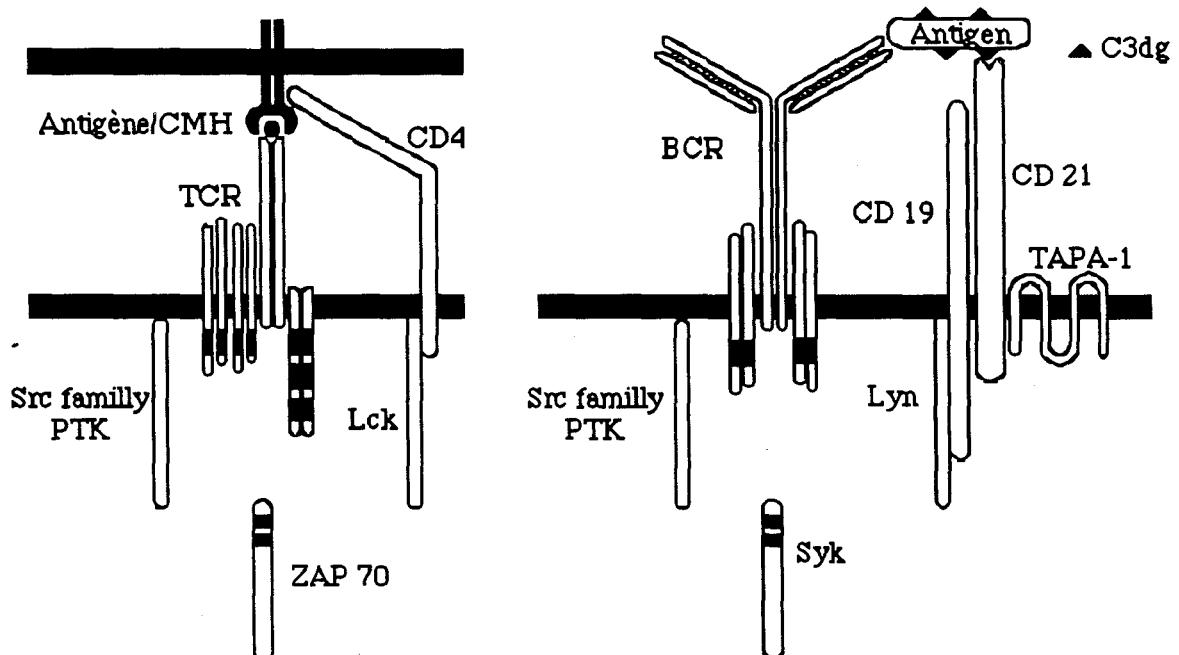
des ponts dissulfures et liés de manière non covalente aux mIg. La molécule Ig α est codée par le gène mb-1 tandis que les deux protéines Ig β et Ig γ sont codées par le même gène B29; la protéine Ig β représentant la séquence complète. Cette différence entre ces deux protéines (la protéine Ig γ étant plus courte de 3 kDa) se situe dans la partie C-terminale de la molécule puisque tronquée. Ces protéines font partie de la superfamille des immunoglobulines, chacune contenant un unique domaine extracellulaire et un domaine intracytoplasmique transduisant les signaux. Toutefois, le domaine intracellulaire de ces protéines Ig α et Ig β fixe des protéines différentes. Ainsi, la protéine Ig α est associée aux protéines de la famille des kinases Src (fixant Tyn et Lyn mais non Lck) et à une protéine de 38kDa non identifiée à ce jour. La protéine Ig β quant à elle fixe des protéines de 42 et 40 kDa non identifiées, tandis qu'une sérine-thréonine kinase se lie aux deux.

2. 4 LA MOLECULE CD 40

Les cellules B nécessitent à la fois des interactions cellulaires, la présence de l'antigène, et une interaction dépendant des molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II avec les cellules T, pour proliférer et se différencier. Cette croissance et cette différenciation sont médiées par des cytokines, agissant indépendamment de la présence de l'antigène et dépourvues de toute restriction génétique, lorsque les cellules B sont activées. Or, il s'est avéré qu'il était possible d'induire la prolifération des cellules B au repos par des membranes plasmiques de cellules T. Ces résultats montraient ainsi l'existence d'un facteur membranaire susceptible de conduire à un effet direct des cellules T activées sur les cellules B et ce en l'absence d'antigène. Cette molécule de surface est dénommée CD40 (Noelle *et al.*, 1992; Law et Clark, 1994). Elle est exprimée sur les cellules B matures et immatures, certains carcinomes, les cellules interdigitées présentes dans les zones des cellules T au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les cellules folliculaires dendritiques et les cellules de l'épithélium thymique. Il s'agit d'une protéine de 45-40 kDa, dont 193 acides aminés constituent le domaine extracellulaire, une région transmembranaire et une partie intracytoplasmique. L'utilisation d'anticorps anti-CD40 stimule de manière prolongée la croissance et la différenciation des cellules B. Plus récemment, il a été montré que ces anticorps étaient susceptibles de prévenir des mécanismes de mort cellulaire programmée ou apoptose des cellules B des centres germinatifs, suggérant un possible rôle de cette protéine dans la sélection des cellules B.

Le ligand de la protéine CD40 est une glycoprotéine de 39 kDa, gp39 qui fait partie de la famille des protéines membranaires de type II, exprimée sur les cellules T en particulier (Lederman *et al.*, 1993; Noelle *et al.*, 1992; Hollenbaugh *et al.*, 1992). Cette protéine présente des homologies avec le TNF α et le TNF β (Armitage, 1994). Toutefois, la protéine recombinante gp39 apparaît faiblement mitogénique quoique synergique avec le PMA ou des anticorps anti-CD20. Cette molécule CD20, comme la molécule CD40, intervient dans la prévention de la mort des cellules B par apoptose (Valentine et Licciardi, 1992).

Outre la molécule CD40, la molécule CD19 formant un complexe avec la molécule CD21 (Récepteur du complément CR2), et la molécule CD22, ligand de la molécule CD45, s'avèrent également jouer un rôle prépondérant dans l'activation et la régulation B (Fearon, 1993; Peaker, 1994).



Comparaison des récepteurs spécifiques des cellules T et des cellules B.

LES CELLULES PRÉSENTATRICES

Si la cellule T est la clef de voûte de la régulation immunitaire, elle n'en demeure pas moins "aveugle" quant à sa perception et à sa reconnaissance de l'antigène. Elle nécessite en effet l'aide d'un second partenaire cellulaire appelé cellule présentatrice de l'antigène (CPAg) capable de le lui présenter en association avec les molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe différents types de cellules présentatrices:

- Les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse initiant les réponses primaires.
- Les cellules folliculaires dendritiques, intervenant plus tardivement en réponse secondaire.
- Les cellules B.
- Les cellules macrophagiques

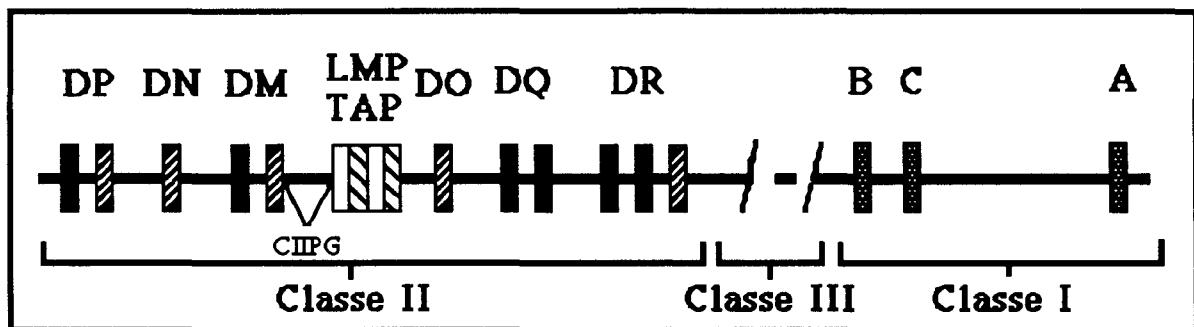
Or, les cellules T naïves se trouvent au niveau des tissus lymphoïdes et présentent une faible capacité de migration. Lors du premier contact avec l'antigène celui-ci devra être transporté jusqu'à elles pour pouvoir les activer. Les cellules dendritiques s'avèrent essentielles à ce transport et sont les plus efficaces. Par contre, les cellules T mémoires, circulantes, peuvent être réactivés par des cellules "moins professionnelles" comme les cellules B.

3.1 LE RECEPTEUR ANTIGENIQUE

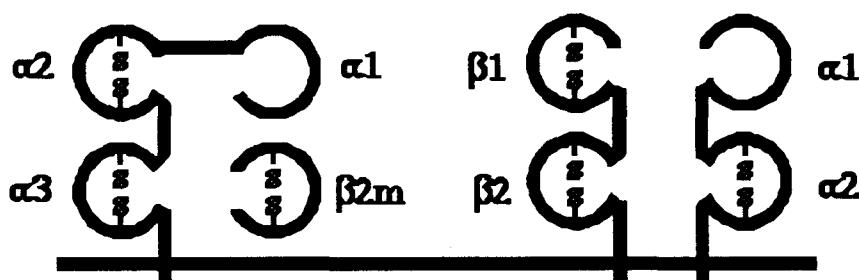
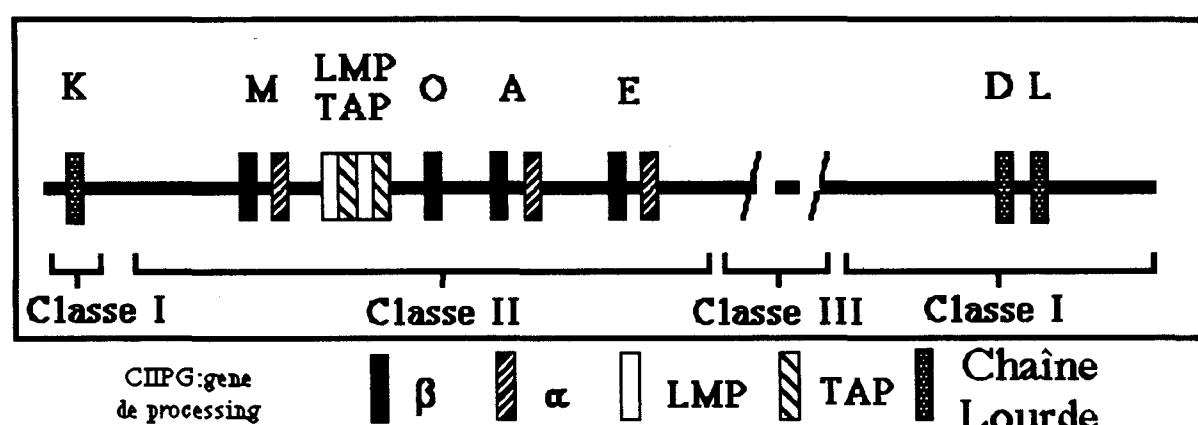
On sait depuis une vingtaine d'années que les antigènes sont présentés fragmentés aux lymphocytes T en association avec des protéines codées par le CMH, appelé HLA (Human Leucocyte Antigen) chez l'homme et H2 chez la souris (Dausset et Pla, 1989; Klein, 1979; Möller, 1985). Il représente en outre une source très riche d'informations quant à notre évolution et ce vis-à-vis du monde extérieur qui nous agresse. Décrit, dès 1958 par Jean Dausset, le système HLA a constitué pendant de très nombreuses années la base de la compatibilité tissulaire entre donneur et receveur de greffes d'organes. Il est la clef du contrôle génétique des réponses immunitaires (Sasazuki *et al.*, 1983; Benacerraf et McDevitt, 1972).

Ces protéines codées par le complexe majeur d'histocompatibilité appartiennent à deux classes, appelées classe I et classe II.

HLA Humain



H-2 Murin



Classe I Classe II

Organisation génomique du
Complexe Majeur d'Histocompatibilité;
organisations des domaines des molécules
de classe I et de classe II.

a) Les molécules de CMH de classe I

Les molécules de classe I sont des glycoprotéines membranaires constituées d'une chaîne lourde α polymorphe de 43 KDa liée de façon non covalente à un petit peptide de 12 KDa non glycosylé et monomorphe, la $\beta 2$ microglobuline ($\beta 2m$). Chez l'homme, bien que seulement trois loci HLA de classe I (HLA-A, B, C) soient extensivement analysés, environ 20 gènes ont été détectés par les méthodes de génétique moléculaire. La taille du gène est en règle générale de 3,5 kb. L'inventaire des tissus et cellules exprimant les molécules HLA-A, B, C montre une distribution quasi ubiquitaire quoique des variations quantitatives importantes existent. En outre, les gènes HLA-E, F, G, H se distinguent des gènes HLA-A, B, C par leur polymorphisme limité et par leur expression faible ou nulle à la membrane cellulaire. La molécule HLA-G occupe une place particulière en raison de son expression importante à la membrane des trophoblastes.

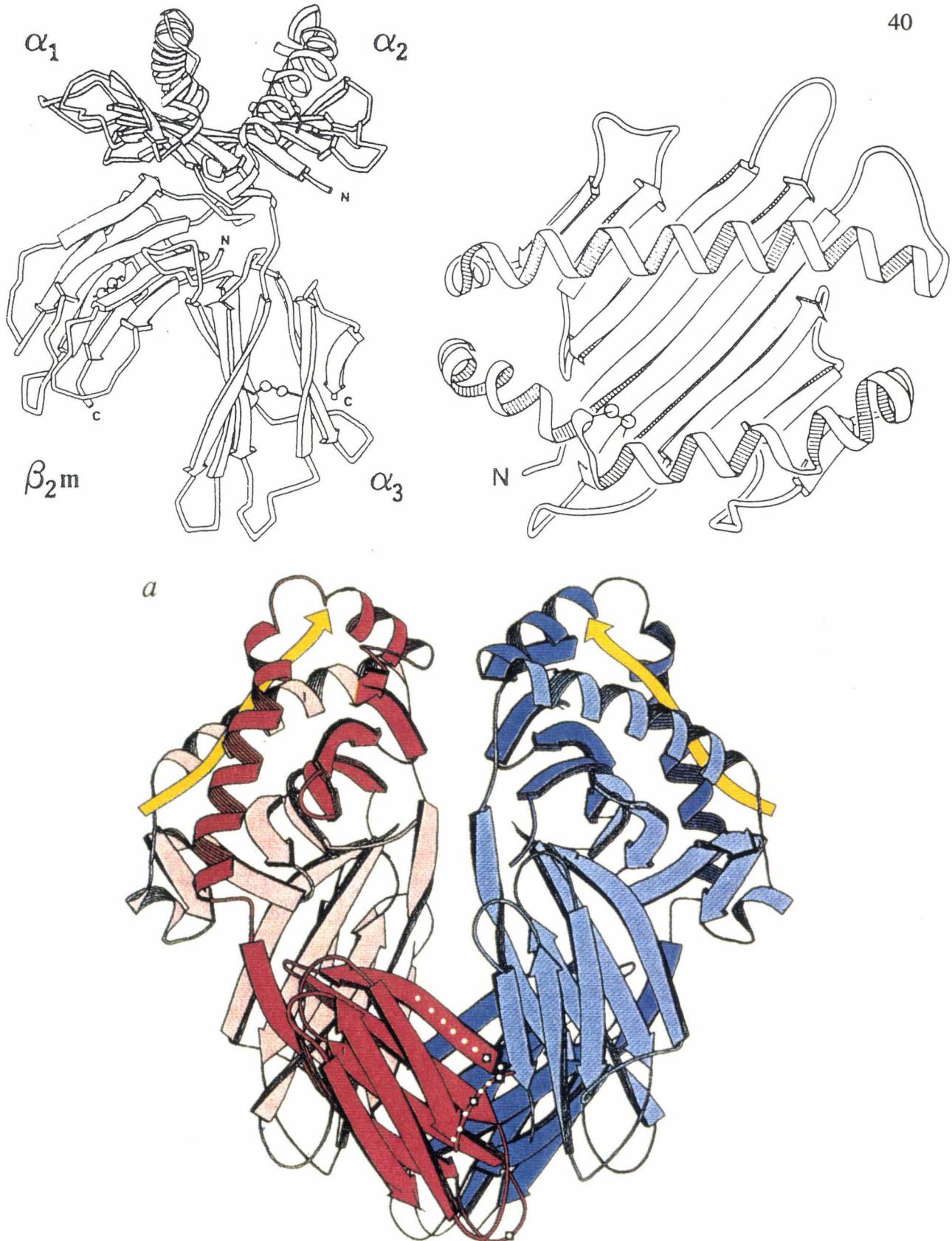
La partie extracellulaire de la chaîne α est organisée en trois domaines $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$, seuls les deux premiers domaines étant polymorphes. La cristallisation (Bjorkman *et al.*, 1985, 1987, 1989) de la première molécule de CMH de classe I (HLA-A2) a montré que les domaines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont structurés de manière à présenter une poche ou sillon dont le fond est composé de huit feuillets β et les bords de deux hélices α . Ce sillon expose la quasi-totalité des résidus polymorphes de la chaîne α et accueille de petits peptides dont la taille optimale est d'environ 9 résidus (Chen et Parham, 1989; Falk *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1992; Jardetsky *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1991; Townsend et Bodmer, 1989).

Le niveau d'expression des molécules de classe I peut être modulé sous l'action de cytokines produites au cours de la réaction inflammatoire. Les trois interférons α , β et γ ainsi que le TNF α augmentent l'expression des molécules de classe I.

b) Les molécules de classe II

Les molécules de classe II (Kaufman *et al.*, 1984), contrairement aux molécules de classe I, ne sont exprimées qu'à la surface de certaines cellules parmi lesquelles on trouve essentiellement les macrophages, les lymphocytes B et certaines cellules épithéliales. Chez l'homme, ces cellules expriment en général trois ou quatre formes isotypiques: une ou deux molécule DR, une molécule DQ et une molécule DP; la molécule DR étant la plus représentée.

Les molécules de classe II sont des glycoprotéines membranaires constituées de deux chaînes polymorphes α et β de 34 et 28 KDa liées de façon non



STRUCTURE TRIDIMENTIONNELLE
DES MOLECULES DE CLASSE I ET DE
CLASSE II.

covalente. Le polymorphisme de ces molécules est porté par le premier domaine $\alpha 1$ et $\beta 1$ de chaque chaîne. Toutefois, la chaîne $DR\alpha$ est nettement moins polymorphe que la chaîne β . La connaissance de nombreuses séquences a permis de préciser la localisation des régions variables et conservées. Ainsi, comme pour les molécules de classe I, variabilité et polymorphisme sont situés principalement au niveau du site de reconnaissance antigénique. Par analogie de séquence avec la molécule de classe I, la modélisation moléculaire de la structure tridimensionnelle de la molécule de classe II avait permis de prédire que ces deux domaines polymorphiques s'associaient pour former un sillon semblable à celui des molécules de classe I (Brown *et al.*, 1988). Plus récemment, la cristallographie (Brown *et al.*, 1993) de cette molécule a conforté cette première hypothèse et a montré que ce sillon est capable de présenter de petits fragments peptidiques d'une taille d'environ 15 acides aminés (Chicz *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1992; Rudensky *et al.*, 1991).

Certains tissus semblent constitutivement riches en molécules de classe II tels que les endothélium capillaires et de nombreux épithélium proches directement ou indirectement du monde extérieur. Inversement, les cellules et les tissus les moins exposés au monde extérieur expriment nettement moins de molécules de classe II voire sont négatives. Toutefois, dans de nombreux cas l'expression de ces molécules de classe II est inductible. L'IFN γ , le TNF α , l'IL-4, et le GM-CSF entraînent une augmentation des molécules de classe II. Dans le thymus, les molécules de classe II sont exprimées sur les cellules épithéliales du cortex et de la medulla, et sur les cellules dendritiques d'origine hématopoïétique. Les lymphocytes T humains négatifs au repos, expriment des quantités importantes des molécules de classe II lorsqu'elles sont activées.

Ainsi, qu'il s'agisse des molécules de CMH de classe I ou de classe II, leur principale fonction est de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T. Cette représentation fonctionnelle des molécules de classes I et de classe II est compatible avec la restriction bien connue des réponses lymphocytaires T au CMH:

- Les lymphocytes T-cytotoxiques (CD8) reconnaissent les antigènes viraux associés aux molécules de classe I.
- Les lymphocytes T-auxiliaires reconnaissent les combinaisons antigène-molécule de classe II, permettant aux cellules B et aux cellules T cytotoxiques de répondre vis-à-vis des agents exogènes.

3.2 LES CELLULES DENDRITIQUES

a) *La cellule dendritique*

Les cellules dendritiques sont des cellules à haut pouvoir de présentation à la fois qualitatif et quantitatif (Klaus *et al.*, 1980, Heinen *et al.*, 1988, Steinman, 1991). *In vitro*, ces cellules sont associées de manière physique aux cellules T, formant des agrégats. Ni les macrophages, ni les cellules B au repos sont capables de former ces agrégats avec les cellules T. Ces agrégats s'avèrent être essentiels à l'activation cellulaire T (King et Katz, 1990) et s'effectuent indépendamment de la présence de l'antigène. La constitution de ces agrégats est médiée d'une part à une interaction bidirectionnelle entre les molécules CD11a/CD18-CD54 (LFA-1-ICAM-1) et d'autre part par une interaction unidirectionnelle entre les molécules CD58 (LFA3) et CD2. De plus, au stade initial de la constitution de ces formes agrégées, l'interaction entre les molécules de CMH de classe II et les molécules CD4 s'avère prépondérante dans la fonction des cellules dendritiques. En outre, un rôle physiologique de "désialylation" a été observé, mécanisme jouant un rôle prépondérant lors de la présentation et de l'agrégation. En effet, les répulsions mutuelles exercées par les cellules au repos sont liées à la présence de charges négatives dues à l'acide scialique présent sur les molécules de surface. Le gène qui code pour cette enzyme endogène est dans la même région que ceux qui codent pour le complexe majeur d'histocompatibilité. En présence de l'antigène, les cellules dendritiques entraînent une activation des cellules T.

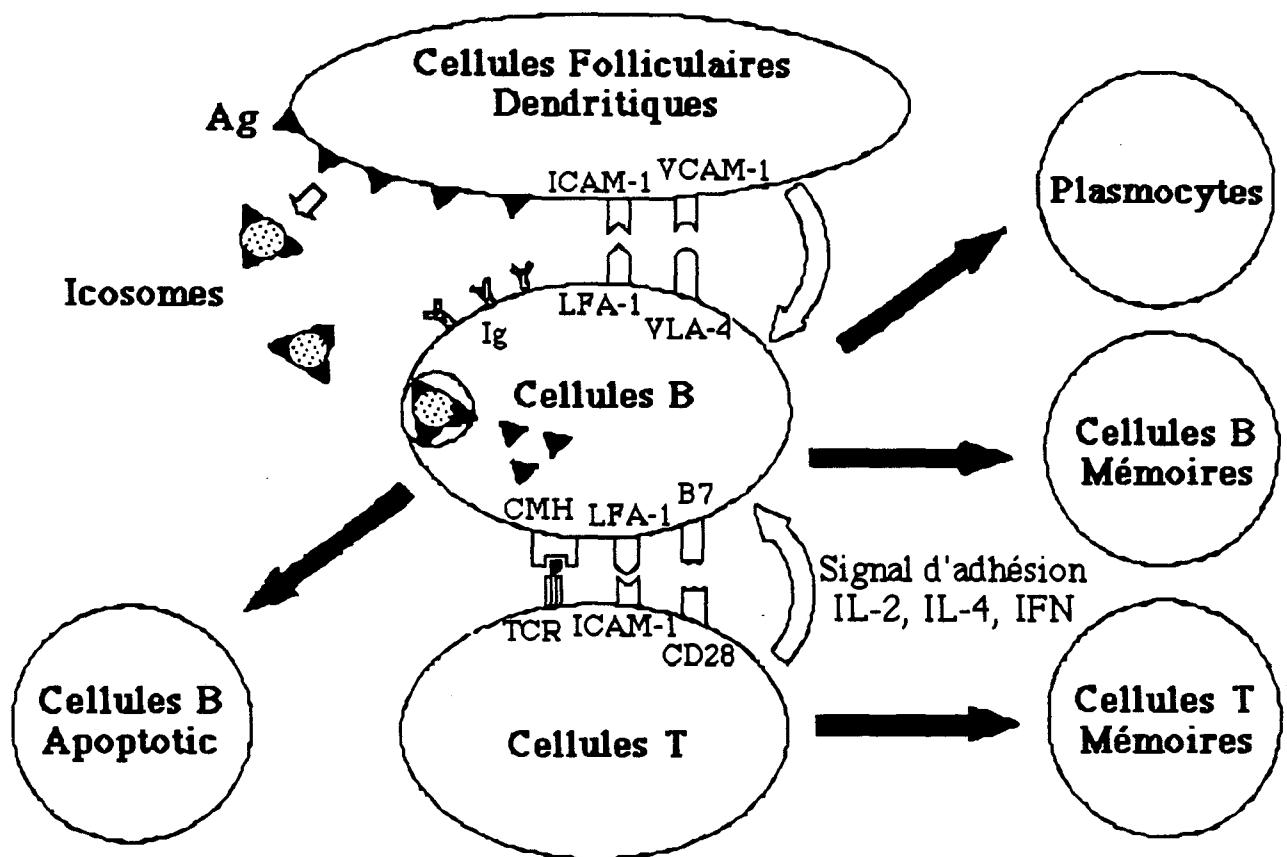
Le rôle de ces cellules a pu être démontré, *in vivo*, de plusieurs façons:

- Ainsi, après immunisation et récupération des cellules dendritiques provenant de la rate, ces cellules étaient capables d'activer des clones T de manière beaucoup plus efficace que les macrophages (100 fois supérieur).

- La préincubation des cellules dendritiques en présence de l'antigène suivi de leur injection chez l'animal conduit après rappel à une potentialisation de la réponse humorale.

Ces résultats révèlent une part active et majeure de ces cellules au cours de la réponse primaire à l'antigène (Sornasse *et al.*, 1992; Knight et Stagg, 1993)

Les cellules dendritiques n'expriment qu'un très petit nombre de marqueurs membranaires appartenant à la lignée monocyttaire/macrophagique. Ainsi, les cellules dendritiques seraient issues des cellules souches CD34+. Elles expriment cependant de manière très prononcée la molécule B7/BB1, ligand de la molécule CD28 présente à la surface des cellules T, la molécule LFA-3 et de



Représentation schématique de l'interaction cellulaire entre les cellules folliculaires dendritiques (FDC), les cellules B, et les cellules T au niveau des centres germinatifs:

façon majeure les molécules de CMH de classe II.

La cellule dendritique du fait de sa localisation au niveau des centres du trafic lymphocytaire T est LA cellule présentatrice comparée à toute autre cellule circulante (Tew *et al.*, 1990).

b) *La cellule folliculaire dendritique*

Une des cellules susceptibles d'intervenir en réponse secondaire est la cellule folliculaire dendritique (Kosko et Gray, 1992; Tew *et al.*, 1980). Ces cellules présentent un phénotype différent de celui des cellules dendritiques et macrophagiques. Quant à leur origine, elles proviendraient de cellules fibroblastiques du réticulum, hypothèse toutefois discutée. Dans les ganglions, les cellules folliculaires dendritiques présentent des dendrites contenant des icosomes qui peuvent transférer l'antigène aux cellules B (Szakal *et al.*, 1988). L'antigène reste ainsi localisé sur ces cellules pendant un temps relativement long, ce qui pourrait être d'une importance extrême pour le maintien de la mémoire immunologique. En outre, elles expriment la molécule CD40, molécule cruciale dans l'activation et la différenciation des cellules B. L'activation des cellules B résultant de cette présentation peut conduire à une stimulation T pendant plusieurs jours au niveau ganglionnaire.

c) *La cellule de Langerhans*

Décrise en 1868, par Paul Langerhans (1849-1888), la cellule épidermique qui porte son nom est une cellule faisant partie de la famille des cellules dendritiques (Schmitt *et al.*, 1989). D'origine médullaire, cette cellule présente des organites cytoplasmiques spécifiques appelés granules de Birbeck (Birbeck *et al.*, 1961). Ces formations correspondent à un accoulement de deux portions de membrane pouvant être associées à des vacuoles. Leurs nombres et leurs tailles varient ayant des formes en bâtonnets ou en raquettes. Ces organites sont liés au processus d'endocytose de la cellule. Les cellules CD1⁺ de la moelle seraient les précurseurs des cellules de Langerhans. Ces cellules sont retrouvées dans l'ensemble du revêtement cutané et dans les épithéliums muqueux (bouche, vagin, rectum, vessie, poumon). On retrouve à la surface de ces cellules plusieurs molécules: d'une part les molécules HLA de classe I (A, B, C), de classe II (DP, DQ, DR), la molécule CD1 (CD1a et CD1c) ainsi que la molécule CD4. Sur la base de la densité d'expression des molécules de classe II, deux populations

peuvent être distinguées (25% de molécules DR+++ et 75% de molécules DR+). Cette expression peut être modifiée par les ultraviolets, les stéroïdes, l'interféron γ et les prostaglandines E2. Toutefois, il existe également à la surface de ces cellules divers récepteurs comme pour le fragment constant des immunoglobulines, ou les fractions du complément C3b et C3d. Les marqueurs monocytaire CD14, CD33 ou la chaîne β des molécules LFA (CD11, CD18), le marqueur d'activation CDw29 (VLA) ainsi que le récepteur pour les IgE ont été mis plus récemment en évidence à la surface des cellules de Langerhans (De Panfilis *et al.*, 1991). Ces cellules sont capables de produire de IL-1 mais également des prostaglandines D2 intervenant dans les réactions inflammatoires (Silberberg *et al.*, 1980).

3.3 LES CELLULES B

A l'inverse des cellules dendritiques, les cellules B ne sont pas capables d'activer des cellules T au repos (Krieger *et al.*, 1985, Jenkins *et al.*, 1990). Par conséquent, pour susciter une réponse humorale *in vivo*, les cellules T doivent reconnaître l'antigène présenté par d'autres cellules. Cependant, le rôle des cellules B dans l'activation des cellules T en réponse secondaire est prédominant (Van Rooijen, 1990). Les cellules B sont clonales et spécifiques et de ce fait présentent une forte affinité. Ainsi, les cellules B sont spécialisées dans la capture de l'antigène au niveau du torrent circulatoire par leurs récepteurs ou anticorps membranaires. Il a pu être montré que des cellules B spécifiques comparées à des cellules naïves étaient 1000 fois plus efficaces pour effectuer *in vitro* une présentation antigénique. Plus l'affinité de l'anticorps augmente au cours du temps, plus l'efficacité des cellules B en tant que cellules présentatrices est accrue. Au cours de la réponse immune ces cellules peuvent rencontrer l'antigène au niveau des centres germinatifs où il existe une accumulation d'antigènes sur les cellules folliculaires dendritiques. Les cellules B, par leur grand nombre et leur localisation particulière, peuvent jouer un rôle prépondérant dans la présentation antigénique.

3.4 LES CELLULES MACROPHAGIQUES

Elles jouent un rôle prépondérant à la fois au cours de l'immunité naturelle ou innée (Do et Hamilton, 1984). Ces cellules sont résidentes et distribuées dans l'ensemble des tissus. Issues de la moelle, à partir des promonocytes, elles se différencient en monocytes avant de migrer dans les tissus

pour se différencier en macrophages. Les monocytes/macrophages expriment des récepteurs pour le mannose et le fucose capables de lier des microorganismes exprimant ces glucides. En outre, ils expriment la molécule CD14, récepteur au lipopolysaccharides (LPS), ainsi que trois types de récepteurs Fc aux immunoglobulines γ : le RFc γ I (CD64) de haute affinité, le RFc γ II (CD32) de moyenne affinité, et le RFc γ III (CD16) de faible affinité. On trouve également le récepteur au complément CR3 (CD11b ou C3bi) et CR1 (CD35 ou C3b); les molécules codées par le CMH de classe II; et d'autres molécules telles que les molécules CD13, CD15, CD68 ou VLA-4 (CD29/CD49d); les récepteurs servant à fixer les anticorps libres ou complexés à l'antigène et ainsi facilitant la présentation de l'antigène aux cellules T (Manca *et al.*, 1991; Lanzavecchia, 1990).

Quant aux molécules sécrétées, celles-ci sont multiples. On trouve des interleukines telles que l'IL1, IL6, IL8 et IL10, des facteurs hématopoïétiques G-CSF, M-CSF, GM-CSF, MIP-1 et MIP-2, l'erythropoïétine ainsi que d'autres cytokines telles que le TGF α et β , le PDGF, le TNF α , l'IFN α et β , et la molécule RANTES (Stout, 1993).

L'activité macrophagique peut-être profondément modulée par la production de certaines lymphokines produites par les cellules T telles que l'IFN γ , à l'inverse par les interleukines 4 et 10 qui sont inhibitrices voire létales pour les cellules macrophagiennes (Oswald *et al.*, 1992).

BASES MOLECULAIRES DE LA RECONNAISSANCE ANTIGÉNIQUE

4.1 LIAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS

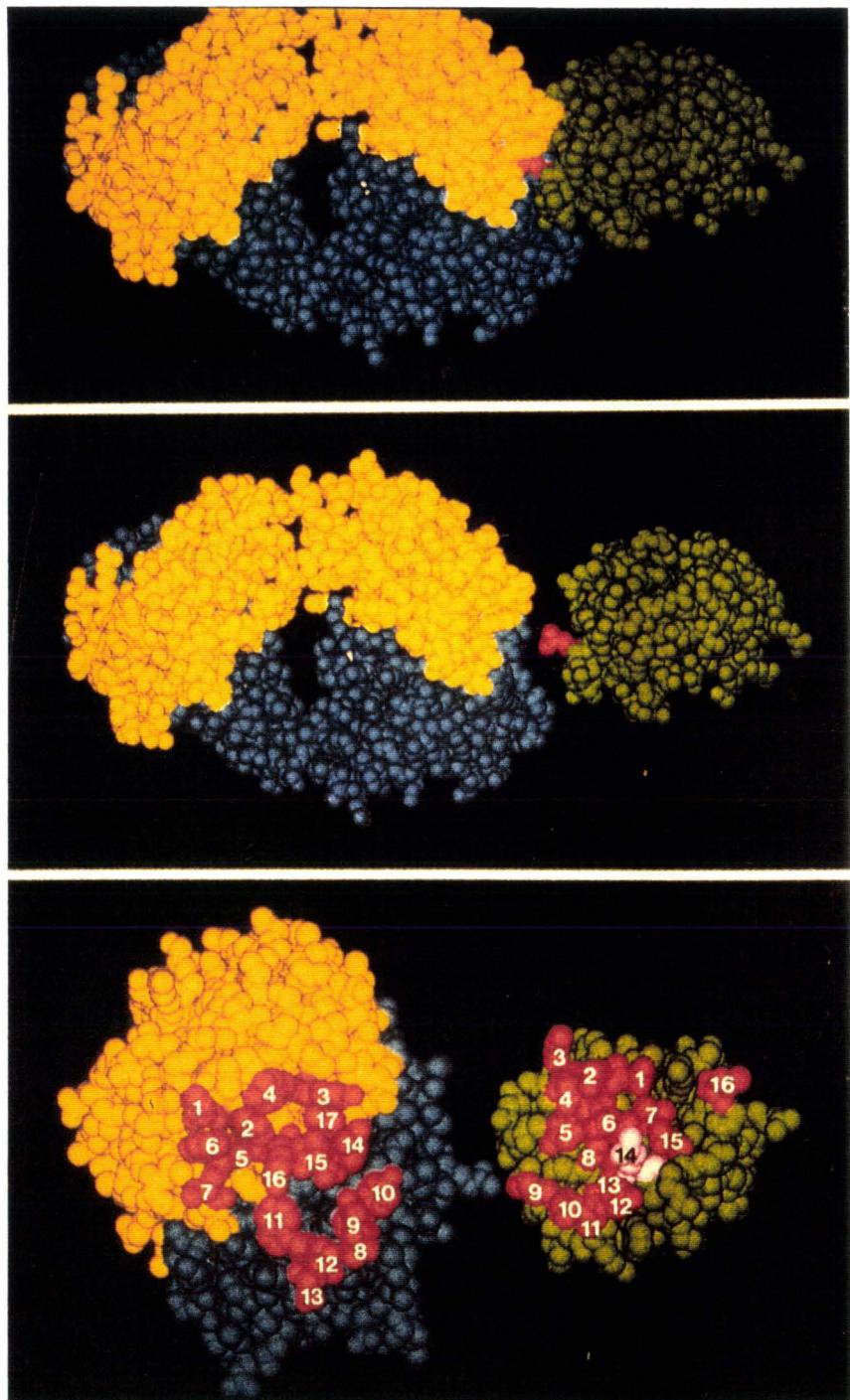
La molécule d'antigène se niche dans le creux formé par les chaînes H et L, appelé site de combinaison de l'anticorps (Amit *et al.*, 1986; Alzari *et al.*, 1988). Les études de cristallographie aux rayons X ont montré que ce sont les acides aminés des régions hypervariables des régions VH et VL, situées à l'extrémité du fragment Fab, qui se lient à l'antigène. Toutes les régions hypervariables contribuent à la formation du site de liaison de l'anticorps, bien que la troisième région hypervariable de la chaîne lourde formée par la jonction V-D-J semble être la plus importante.

Les autres acides aminés des régions V constituent une charpente (“framework”) qui, bien que ne participant pas à la liaison à l'antigène, jouent cependant un rôle important lors du repliement des chaînes des régions V dans le maintien de l'intégrité du site anticorps (Geysen, 1985).

De nombreuses liaisons non-covalentes participent à l'interaction entre l'antigène et les acides aminés du site anticorps. Ces forces requièrent un contact étroit entre les différents groupes réactifs (Tainer *et al.*, 1985).

- Les liaisons hydrogènes résultent de la formation de ponts hydrogène entre des atomes appropriés.
- Les forces électrostatiques sont dues à l'attraction de deux groupes ioniques de charges opposées, situés sur les chaînes latérales de deux polypeptides.
- Les forces de Van der Waals sont créées par interaction entre différents nuages électroniques.
- Les liaisons hydrophobes sont produites par l'association de groupements non polaires et hydrophobes d'où les molécules d'eau sont exclues.

Bien que ces forces attractives (liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, forces de Van der Waals et électrostatiques) soient faibles, comparées aux liaisons covalentes, leur grand nombre permet une énergie de liaison élevée. Une complémentarité parfaite entre le déterminant antigénique (épitope) et le site anticorps (paratope) favorise la formation de forces attractives intermoléculaires et évite la formation de forces répulsives. Ainsi, un anticorps reconnaît plutôt la configuration de l'épitope que des groupements chimiques particuliers. Les



INTERACTION MOLECULAIRE ANTIGENE-ANTICORPS

anticorps sont très spécifiques et reconnaissent de petites différences dans la structure primaire d'un antigène ou des différences de charge, ou de conformation stérique (Berzofsky, 1985).

La force de liaison antigène-anticorps est appelée affinité de l'anticorps; elle représente la somme des forces attractives et répulsives décrites ci-dessus. L'anticorps, avec ses quatre chaînes polypeptidiques, possède deux sites de liaison pour l'antigène. Quand un antigène multivalent se combine à plus d'un site anticorps, l'énergie de liaison qui en résulte est de beaucoup supérieure à la somme des énergies de liaison de chacun des sites impliqués. L'avidité désigne la force avec laquelle un anticorps multivalent se lie à un antigène multivalent. Je reprendrais cette métaphore du Prof. Jean Pierre Revillard pour décrire la différence entre avidité et affinité, ainsi " Lorsqu'un singe est agrippé à sa cage par ses membres antérieurs (affinité), il aura d'autant plus de stabilité et de force à se tenir à cette cage que ces membres postérieurs participeront à cette liaison (avidité); quatre valent mieux que deux!"

En outre, la spécificité d'un sérum immun résulte de l'addition de l'ensemble des réactivités de tous les anticorps présents, chacun d'eux réagissant avec différentes régions de la molécule d'antigène et même avec différentes parties d'un même déterminant. Cependant, lorsque certains déterminants d'un antigène A sont communs avec ceux d'un autre antigène B, une fraction des anticorps dirigés contre l'antigène A réagira également avec B. On parle alors de réaction croisée.

4.2 LIAISON ANTIGENE-MOLECULE DE CMH

Les aspects cellulaires de la reconnaissance antigénique liés à la formation d'un complexe entre les peptides générés et les molécules codées par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de classe II ont été activement recherchés au cours de ces dix dernières années. Les principales étapes survenant au cours de la présentation antigénique (Buus *et al.*, 1987; Babbitt *et al.*, 1985; Germain, 1986, 1991; Allen, 1987; Brodsky et Guagliardi, 1991) peuvent être schématisées ainsi:

Entrée de l'antigène dans le compartiment intracellulaire (pinocytose, phagocytose, internalisation) ou antigène intracellulaire, dénaturation et dégradation partielle appellée plus couramment "processing", transport du fragment peptidique issu de cette digestion jusqu'aux vésicules qui contiennent les molécules codées par le CMH, puis formation du complexe peptide-CMH et

exportation à la surface cellulaire. Une fois à la surface de la cellule, le complexe peut être reconnu par les cellules T qui portent le récepteur spécifique de cet antigène complexé.

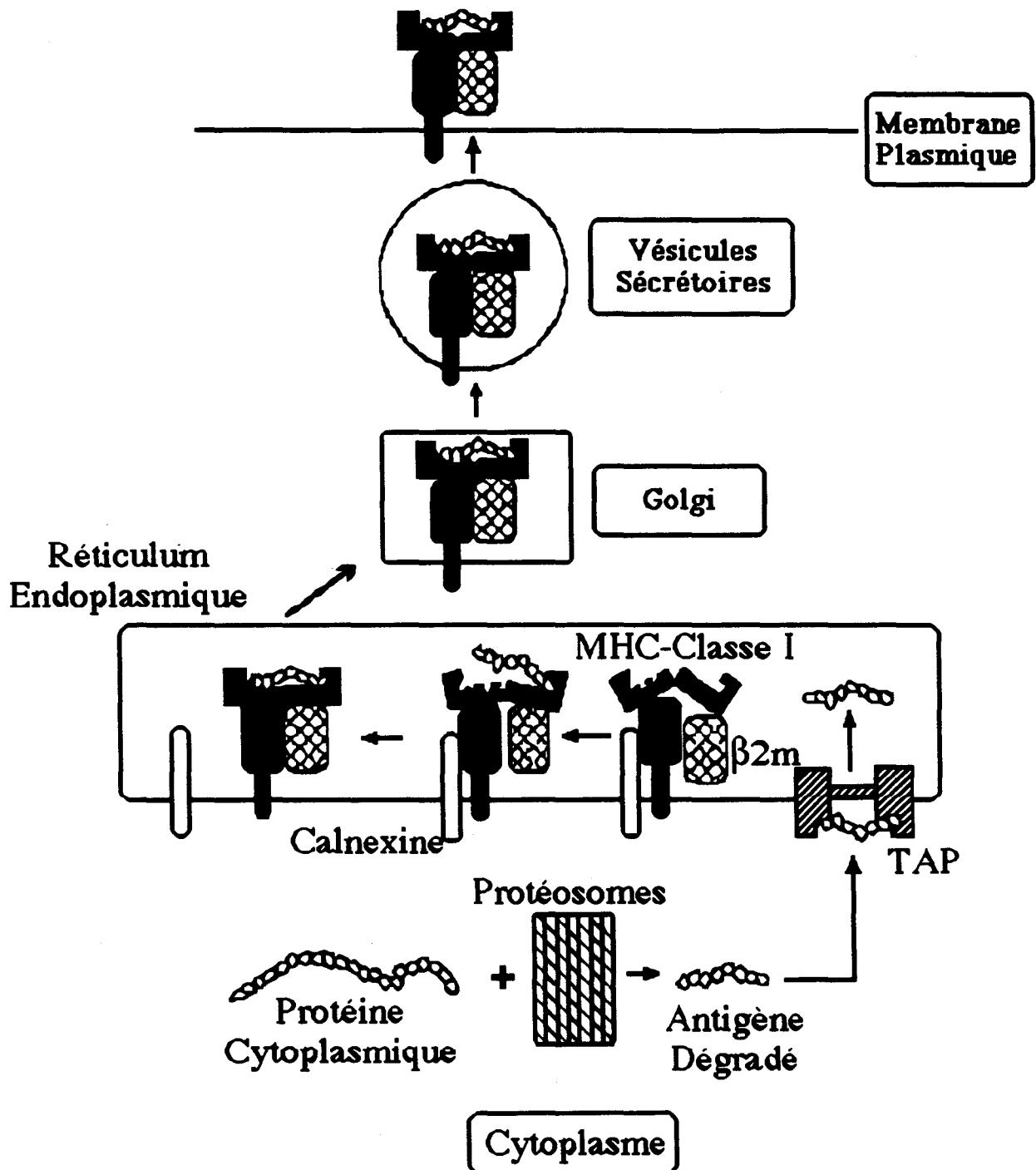
a) L'adressage moléculaire

Quoique la reconnaissance antigénique par les molécules de classe I et classe II s'apparente, les voies par lesquelles se forment ce complexe sont distinctes. Ainsi, les molécules de CMH de classe I fixent essentiellement des peptides dérivés de virus, de bactéries intracellulaires, ou de protéines endogènes. A l'inverse, les molécules de CMH de classe II sélectionnent plutôt des produits dérivés des protéines extracellulaires internalisées. Celles-ci peuvent être solubles ou faisant partie de structure provenant de microorganismes. Il a été ainsi proposé que les peptides associés au classe I provenaient du cytosol tandis que les molécules de classe II fixaient ceux du compartiment vésiculaire. D'où le dogme de restriction de compartimentation établi: Classe I-peptide endogène, classe II-peptide exogène.

- Les molécules de classe I:

Le cytoplasme de la cellule apparaît être le site initial de la dégradation des structures protéiques. Les peptides de la voie endogène cytosolique sont par conséquent transportés du cytoplasme au réticulum endoplasmique où ils interagissent avec les molécules du CMH (Rotzschke et Falk, 1991; Cox *et al.*, 1990; Elliott, 1991). Deux classes de gènes ont pu être identifiées ayant trait à des fonctions de transport et de génèse de ces peptides (Robertson, 1991; Momburg *et al.*, 1994).

La première classe est représentée par deux familles de gènes codant pour des protéines de transport membranaire qui présentent comme caractéristiques de fixer l'ATP. Les protéines TAP (Transporter Associated with antigen Processing), codées par les gènes TAP 1 et TAP 2, insérées dans la membrane du réticulum endoplasmique, permettent le transport du peptide du cytosol vers les molécules de CMH via un canal transmembranaire (Kelly *et al.*, 1992; Koppelman *et al.*, 1992; Kleijmeer *et al.*, 1992; Powis *et al.*, 1992; Trowsdale *et al.*, 1990; Monaco *et al.*, 1990; Deverson *et al.*, 1990). Ces deux gènes sont codés dans la région du locus qui code pour les molécules de classe II, chez l'homme, la souris et le rat. Ces gènes codent pour des pores membranaires capables de transporter les peptides à travers la membrane du réticulum et forment ainsi une "pompe à



Présentation antigénique par les molécules de CMH classe I

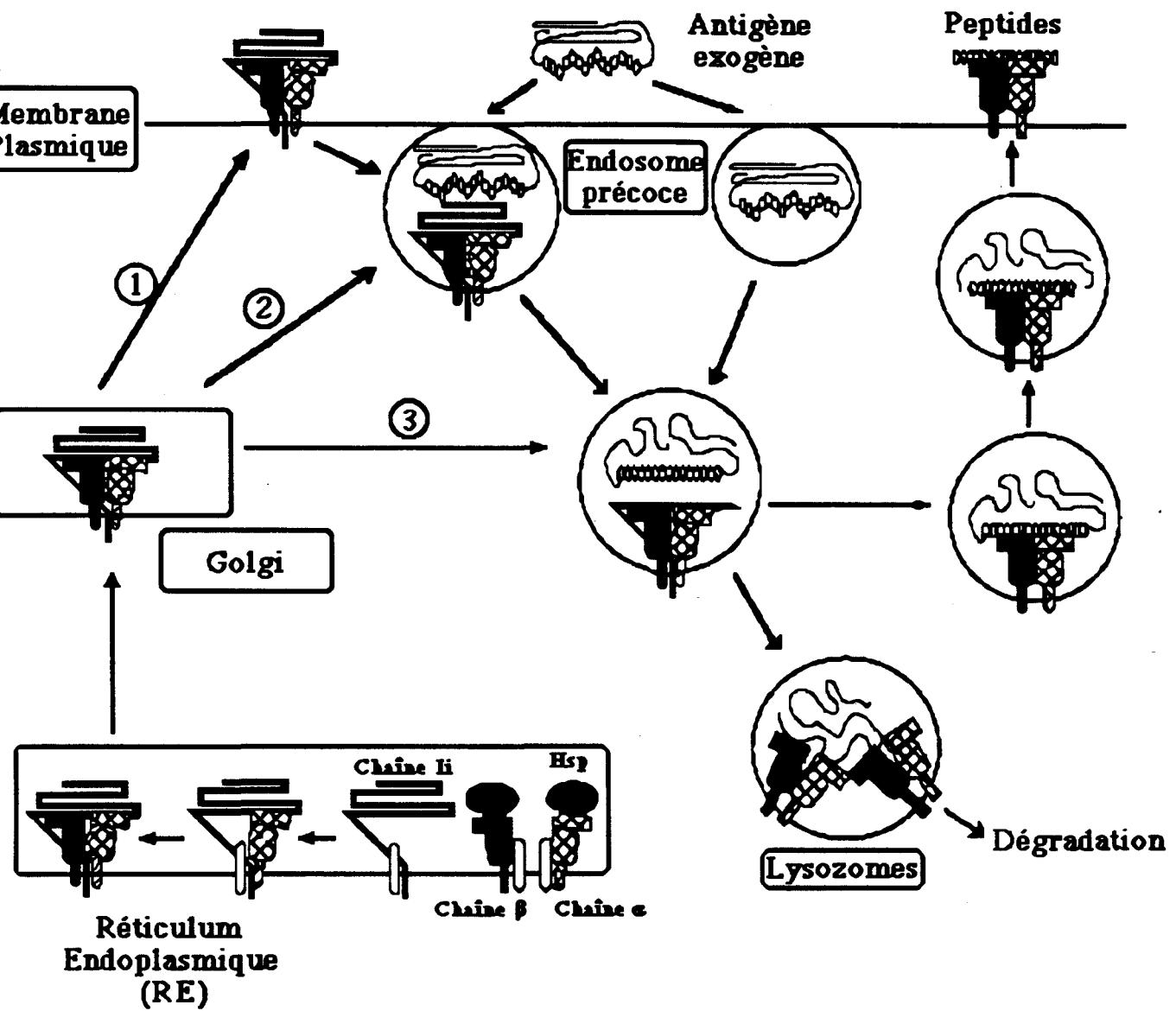
peptide". En outre, le polymorphisme de ces molécules influence directement les caractéristiques des peptides présentés par les molécules de CMH de classe I ainsi que le temps de traversée de l'appareil de Golgi par ces molécules.

La deuxième classe concerne des protéases appelées protéasomes (LMP: "Large Multifunctional Protease") (Martinez et Monaco, 1991; Arrigo *et al.*, 1988; Glynne *et al.*, 1991; Goldberg et Rock, 1992; Kelly *et al.*, 1991). Les deux gènes LMP2 et LMP7 sont codés dans la même région que celle des gènes de transports à savoir dans la région des molécules de CMH. Les protéines résident dans le cytosol cellulaire sous forme de particules en anneau de 19S, formé de 16 sous-unités protéiques de 15 à 30 kDa. Les protéines du protéasome ne sont pas glycosylées, et sont inductibles par l'IFN γ .

Le mécanisme par lequel le complexe, formé par le peptide, la chaîne α de classe I, la β 2-microglobuline, montre une succession d'étapes décisives dans la mise à la surface du complexe (Perarnau *et al.*, 1990; Rock *et al.*, 1991; Kozlowski, 1991). Ainsi, une protéine de 88 kDa (chaperon) retenue dans le réticulum endoplasmique (RE) se fixe transitoirement à la chaîne α nouvellement synthétisée et ce très précocément (Degen *et al.*, 1992). Elle demeure fixée jusqu'à la formation du complexe classe I- β 2 microglobuline transitant dans le moyen Golgi. L'ensemble est alors stable et verrouillé pour être transporté vers la surface cellulaire. Cette protéine est libérée une fois la fixation du peptide dans la poche formée par les domaines α 1 et α 2 de la molécule de classe I. Cette libération de la molécule de 88 kDa permet au complexe de quitter le réticulum endoplasmique (Lie *et al.*, 1990; Parham, 1990).

- Les molécules de classe II

Le lysosome apparaît être l'organelle central où les peptides sont générés (Germain et Hendrix, 1991). Quant à leur sortie les résultats actuels ne permettent pas de définir précisément les différentes étapes. Cependant, les protéines de choc thermique capables de fixer des peptides apparaissent être des candidates possibles de cette exportation, elles s'apparenteraient aux protéines TAP. La localisation des molécules de classe II semble se situer au niveau de l'endosome qui contient des cathepsin D et ce au niveau de lignées B. En effet, cette compartimentation apparaît bien différente selon les cellules étudiées. Sur des cellules B transformées par le virus d'Epstein Bar (EBV), il s'agit de vésicules qui contiennent la β -hexosaminidase, et la cathepsin. Quant aux macrophages, c'est à la fois au niveau des vésicules proches de la membrane



Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II

plasmique mais n'ayant pas de contact direct avec l'extérieur et des organelles différents du lysozome que les molécules de classe II sont retrouvées (Neefjes et Ploegh, 1992).

En outre, il est désormais clair que la voie endogène peut être également utilisée par les molécules de classe II. La voie endogène est sensible à la brefeldinA contrairement à la voie exogène. A l'inverse de la présentation par les molécules de classe I, qui est non sensible à chloroquine, la présentation par les molécules de classe II peut être inhibée par la cloroquine (Guagliardi *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1991).

Des études biochimiques montrent les effets du pH sur la fixation des peptides aux molécules de CMH et sont compatibles avec cette idée de couplage intracellulaire (Harding *et al.*, 1991; Jensen, 1990). Le pH optimal pour que se réalise cette fixation correspond à un pH légèrement acide. Cependant une acidification du pH aux alentours de 5.5-6.5 conduit à une augmentation du taux d'association et non à celui de dissociation.

Cet effet n'est cependant pas généralisable à l'ensemble des protéines. Cette différence de pH peut être un des facteurs possibles responsables de l'immunodominance entre peptides générés à partir d'une protéine. Le rôle des protéases apparaît également important lors de la génèse peptidique (Thiol protéase, aspartyl protéase).

Au cours de l'assemblage du dimère $\alpha\beta$ dans le réticulum endoplasmique, la molécule de classe II s'associe à une chaîne invariante Ii (Bertolino *et al.*, 1991; Teyton et Peterson, 1992; Anderson et Miller, 1992; Hammerling et Moreno, 1990; Sant et Miller, 1994; Lotteau, 1990). Il s'agit d'une glycoprotéine de 31 kDa qualifiée d'invariante en raison de la constance de son point isoélectrique (8.0), mais elle existe sous deux formes Iip31 et Iip33, elle jouerait un rôle de protéine chaperone. La chaîne Ii forme dans le réticulum endoplasmique un multimère avec les chaînes α et β , au moins un trimère $\alpha\beta$ Ii voir un nonamère constitué de 3Ii et 3 $\alpha\beta$ (Roche *et al.*, 1991; Lamb et Cresswell, 1992). Après la traversée de l'appareil de Golgi, la chaîne Ii se dissocie du dimère $\alpha\beta$ dans le compartiment endosomial acide, permettant la liaison d'un peptide au site de la molécule de classe II (Romagnoli *et al.*, 1993). Le complexe $\alpha\beta$ -peptide, stabilisé par passage dans un compartiment à un pH neutre, est alors exprimé à la membrane cellulaire. En outre, cette fixation entraînerait un changement de conformation (Sadegh-Nasseri et Germain, 1992).

b) L'interaction moléculaire

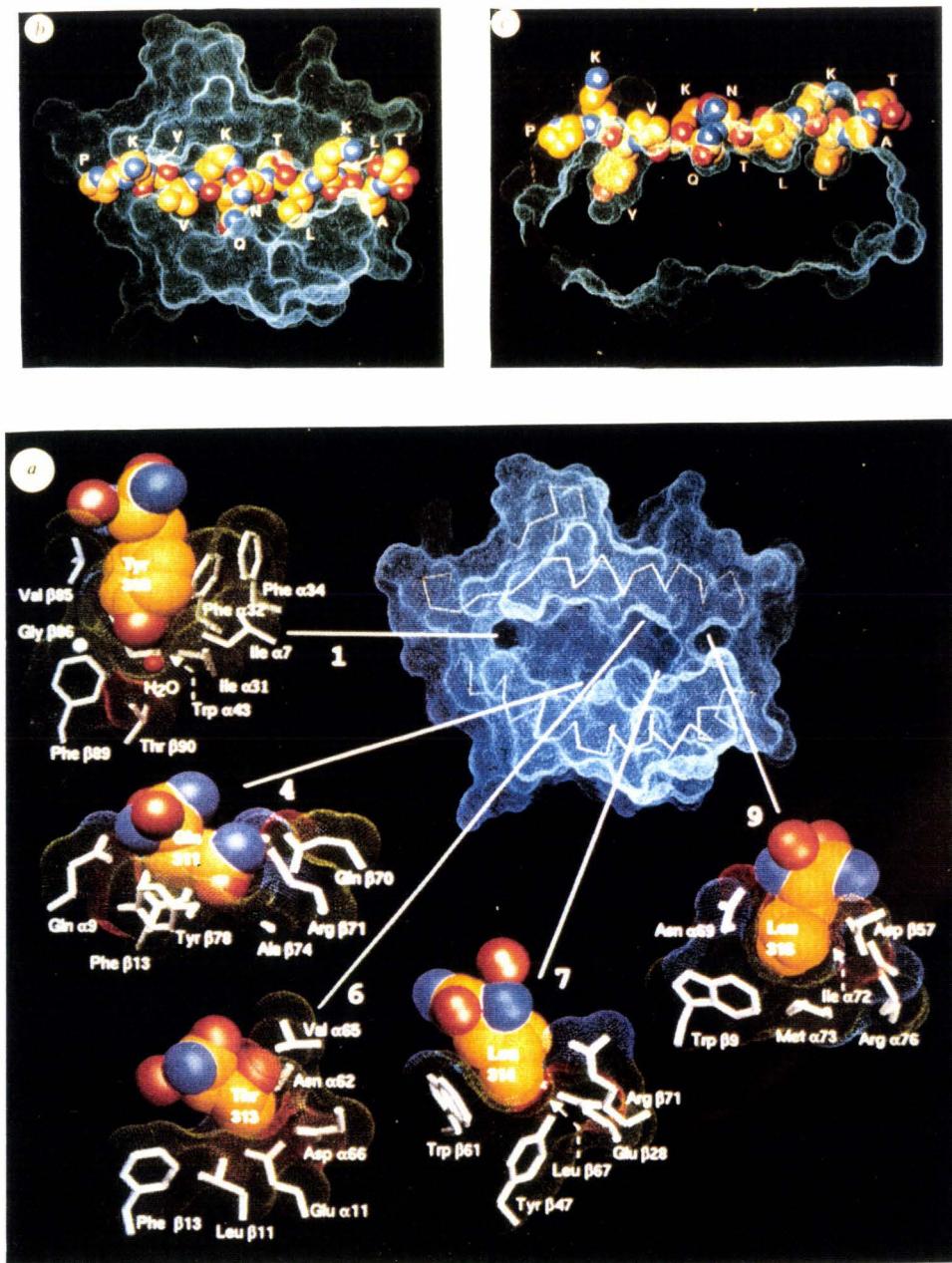
Le polymorphisme des molécules CMH peut être réinterprété en terme de variation allélique à chaque position de la séquence d'acides aminés. La différence entre deux allèles peut varier de 1 à plus de 30 acides aminés. La comparaison résidu par résidu est ainsi plus significative que la comparaison de deux allèles. Une différence d'un acide aminé entre deux molécules peut être fonctionnellement significative et génératrice d'histo-incompatibilité (Buus *et al.*, 1987).

La comparaison des séquences permet une définition complète à la fois du polymorphisme (chaque allèle définissant une séquence originale) et de la variabilité (nombre d'acides aminés différents entre chaque allèle). Une substitution d'un acide aminé peut modifier la capacité de fixation d'un peptide et/ou la reconnaissance par le récepteur T (Krieger *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1989; Norton *et al.*, 1989). Qu'il s'agisse des molécules de classe I ou de classe II, variabilité et polymorphisme sont situés principalement au niveau du site de présentation du peptide.

Récemment, de nouvelles méthodes (Joyce et Nathenson, 1994), en particulier une méthode d'élution des peptides associés *in vivo* aux molécules de CMH a été développée; basée sur la solubilisation des molécules de CMH et de leur purification, les peptides associés sont élués à pH acide et peuvent être séquencés. Cette méthode a permis de caractériser non seulement des peptides d'origine virale dans des cellules infectées, mais aussi des peptides autologues qui semblent occuper le site de la majorité des molécules de classe I de la cellule -les molécules de classe I:

Les peptides capables de s'associer à divers allèles de classe I ont été extensivement étudiés (Falk *et al.*, 1990, 1991; Engelhard, 1994; Urban *et al.*, 1993; Rammensee *et al.*, 1993). Ce sont en règle générale des nonamères. Les contraintes d'association à un allèle donné sont définies par les résidus communs aux diverses séquences capables de s'associer à cet allèle. Des motifs consensus spécifiques d'allèles ont été ainsi définis. Ils comportent des acides aminés obligatoires à deux ou trois positions de la séquence appellés résidus d'ancre (Latron *et al.*, 1992; Matsumura *et al.*, 1992).

Les extrémités N et C-terminales du peptide contribuent à sa fixation dans le sillon de la molécule de CMH par des liaisons hydrogènes; cependant la spécificité de l'association semble dépendre principalement des résidus d'ancre qui entrent en contact avec les poches qui ont été décrites au niveau du sillon



INTERACTION MOLECULAIRE PEPTIDE-MOLECULE DE CMH

(Garrett *et al.*, 1989; Guo *et al.*, 1993; Rohren *et al.*, 1993; Carreno *et al.*, 1993). Ils constituent le site de présentation du peptide.

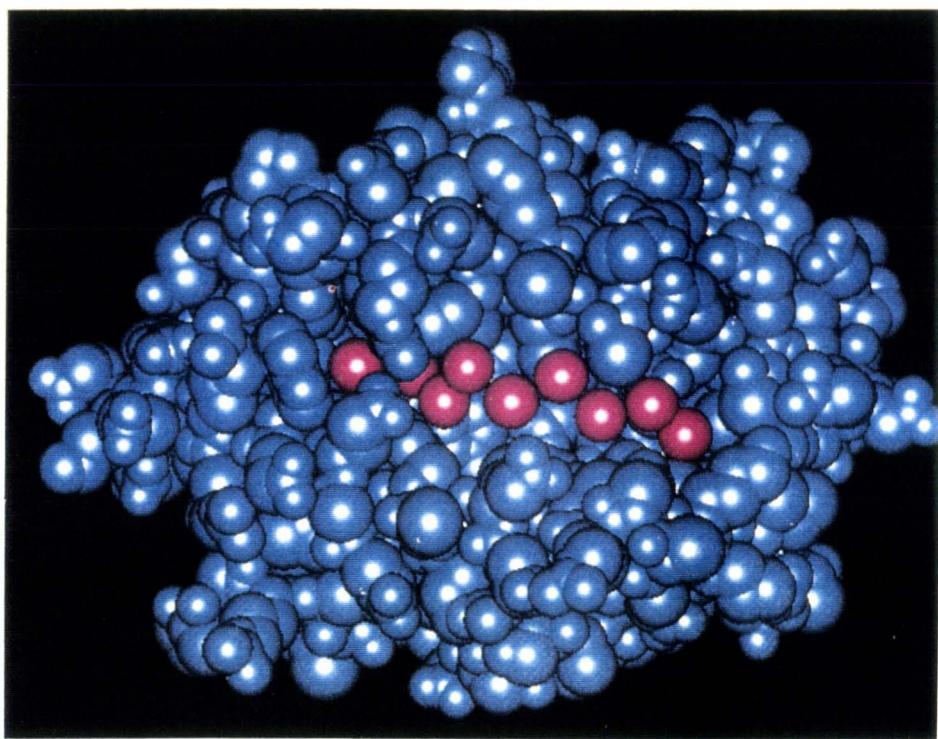
Des expériences introduisant des substitutions au niveau des résidus critiques du peptide et de la molécule présentatrice ont confirmé l'existence des résidus d'ancrage et leur interaction avec les poches. Les différences entre allèles sont concentrées au niveau des résidus constitutifs du sillon et des poches. Ces différences modifient la structure fine et la distribution des charges électrostatiques du site. Chacune des poches peut être libre ou bloquée, chargée positivement ou négativement, hydrophobe ou hydrophile. Ces propriétés leur confèrent la possibilité de se combiner ou non à différents résidus du peptide, et expliquent la spécificité de chaque allèle pour un motif peptidique particulier.

Le peptide en structure allongée est ainsi mis au contact du sillon (Fremont *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1992). Un ou deux résidus de la chaîne peptidique s'associent avec une des autres poches assurant la spécificité de la liaison. La plupart des interactions se font entre des atomes des chaînes latérales du sillon et des atomes de la chaîne principale du peptide. Le peptide est enfoui profondément dans le sillon, de sorte que la majorité (au moins 2/3) de la surface présentée au TCR est constituée par les hélices α de la molécule de CMH, le reste par le peptide. L'extrémité N-terminale est profondément enfouie dans la poche.

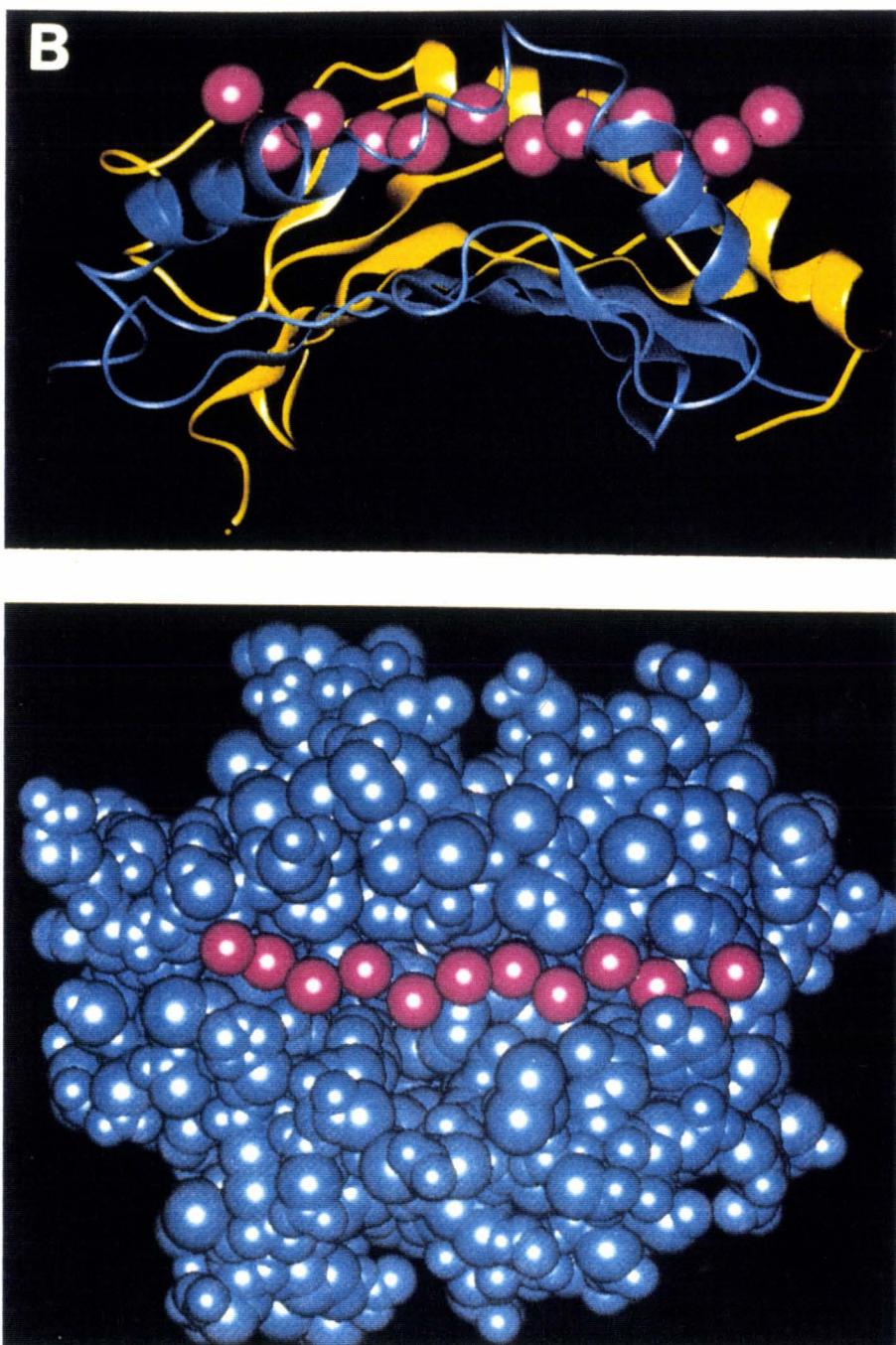
Les molécules de classe II:

Initialement une structure du peptide en hélice α avait été proposée (Allen *et al.*, 1987; Rothbard *et al.*, 1988). Un autre modèle propose une conformation en hélice amphipathique (Berzofsky *et al.*, 1987) dans laquelle le peptide aurait une face hydrophile réagissant avec le TCR et une face hydrophobe se liant à la molécule de CMH. Actuellement, les peptides définis semblent plutôt présenter une structure allongée.

Les peptides naturels associés aux molécules de CMH comportent 13 à 17 résidus (Chicz *et al.*, 1992; Hunt *et al.*, 1992). Leur extrémité N-terminale est parfois bien définie, leur extrémité C-terminale est variable (O'Sullivan *et al.*, 1990). La majorité des molécules de CMH sont chargées *in vivo* de peptides autologues dérivés de protéines membranaires ou de l'environnement de la cellule. De nombreux peptides exogènes associés aux molécules de CMH présentent les mêmes caractéristiques que les peptides naturels. Les voies endogènes et exogènes ne sont pas strictement séparées. Les données encore limitées concernant l'interaction des molécules de CMH de classe II-peptide



MOLECULES DE CLASSE I



MOLECULES DE CLASSE II

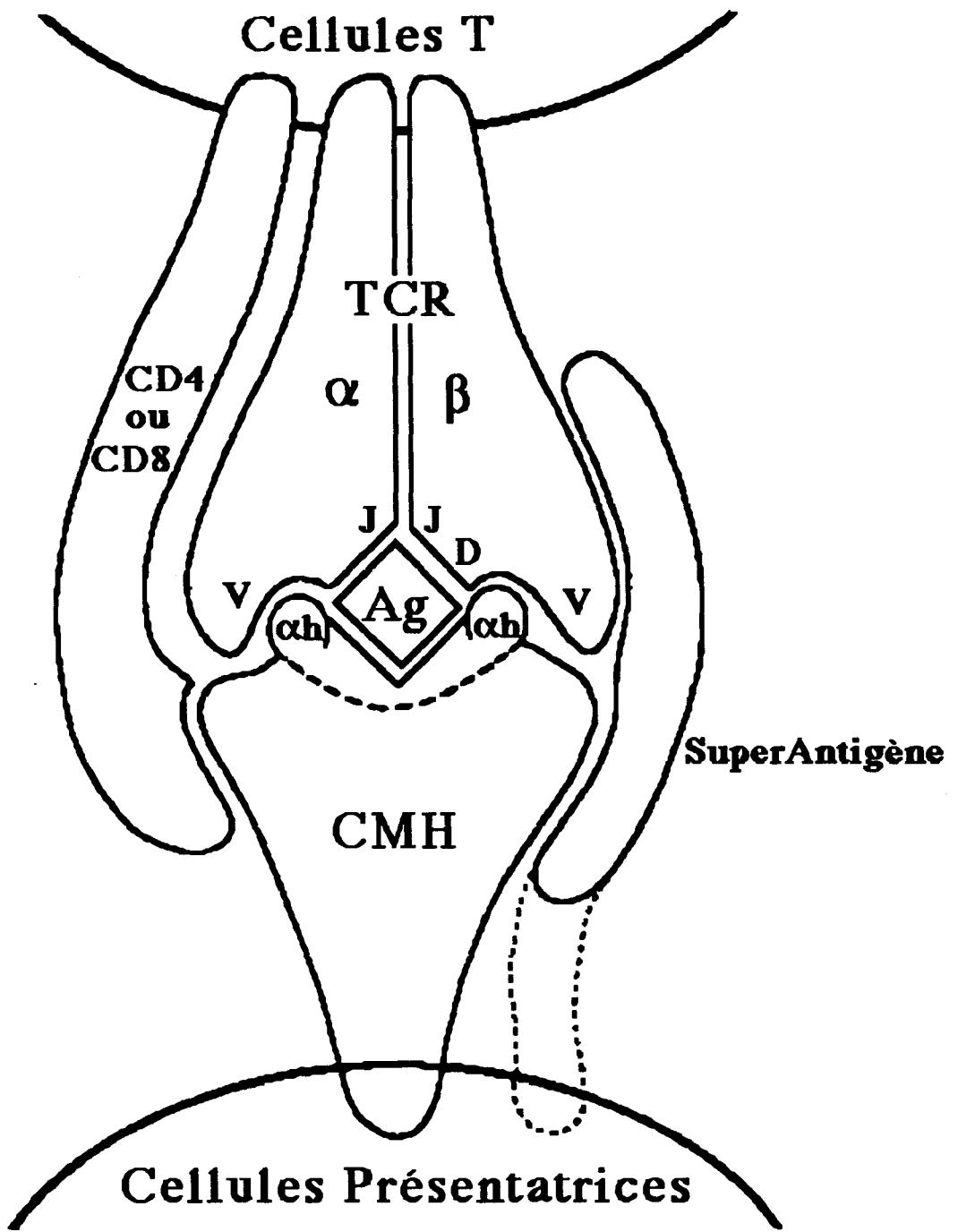
suggèrent qu'elle est essentiellement comparable à celle des molécules de CMH de classe I-peptide. Sa spécificité semble toutefois moins précise (Jardetsky *et al.*, 1990). Des motifs ont été proposés pour les peptides liant la molécule HLA-DR1 (Chicz *et al.*, 1993; Rudensky *et al.*, 1992; O'Sullivan *et al.*, 1991), des études complémentaires ont montré qu'il s'agissait plutôt de motifs spécifiques de plusieurs allèles HLA-DR (Hammer *et al.*, 1993; Rotzschke et Falk, 1994).

Ces résultats suggèrent que, bien que la liaison des peptides aux molécules de CMH de classe I ou de classe II soit essentiellement comparable, des différences significatives existent. Elles semblent indiquer que les contraintes de la liaison molécules de classe II-peptide soient moins sévères que celles de la liaison molécules classe I-peptide.

4.3 La reconnaissance antigénique par le récepteur T

Le domaine variable qui comprend les séquences d'acides aminés codées par les segments V, D, et J, comporte trois régions hypervariables nommées CDR ("Complementary Determining Regions") qui constituent le site de reconnaissance du récepteur T. Le CDR3 correspond à la séquence codée par les jonctions V-D et D-J de la chaîne β ou V-J de la chaîne α . Bien que distantes les unes des autres dans la séquence d'acides aminés, elles se retrouvent rassemblées à la surface de la molécule par une pliure de type immunoglobulinique. La structure du complexe tri-moléculaire n'est pas encore élucidée, cependant l'analogie entre le TCR et le Fab d'une part, et d'autre part, le fait que le TCR reconnaît un peptide, et la surface des hélices α de la molécule de CMH, permettent de proposer un modèle provisoire d'interaction. Selon ce modèle, les CDR3 particulièrement riches en glycine établiraient un contact avec le peptide par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes et hydrogènes. Les CDR1 et CDR2 réagiraient principalement avec les hélices α de la molécule de CMH via des interactions électrostatiques entre des résidus chargés. Ainsi, la variabilité extrême des peptides est reconnue par le plus variable des CDR, le domaine CDR3 (Sorger *et al.*, 1990; Lai *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1990). L'affinité de la liaison du TCR au complexe CMH-peptide est faible de 10^{-4} - 10^{-5} M (Matsui *et al.*, 1991; Weber *et al.*, 1992).

Chaque allèle des molécules CMH présentant de nombreux peptides, le nombre de molécules de CMH présentant un même peptide à la membrane d'une cellule est de quelques centaines (Demotz *et al.*, 1990; Harding et Unanue, 1990). Par ailleurs, chaque cellule T exprime environ 50 000 molécules de TCR identiques. Ces observations ont conduit à proposer un modèle selon lequel le



Reconnaissance peptidique

contact entre la cellule T et l'APC ou la cellule cible est d'abord assuré par les molécules d'adhésion non spécifiques, permettant au TCR d'explorer la surface cellulaire à la recherche de son ligand spécifique. Si celui-ci est trouvé, une redistribution des molécules TCR et complexes CMH-peptide conduit à l'activation de la cellule.

MECANISMES BIOCHIMIQUES DE LA TRANSDUCTION

La transduction du signal est l'étape de la conversion et de l'amplification du stimulus extracellulaire en signal d'activation. Elle met en jeu divers seconds messagers de l'activation. Leur nombre quoique faible en comparaison du grand nombre de signaux reçus par les molécules activatrices tels que les antigènes, hormones, cytokines, récepteurs divers laisse à supposer soit l'existence de signaux inconnus à ce jour, soit une combinaison ou une intensité différentielle de ceux-ci dans la génèse du signal.

Trois voies principales de transduction concernent les lymphocytes T (Crabtree, 1989; Damjanovich, 1992) :

- La voie de la phospholipase C mettant en jeu l'inositol triphosphate (IP3), le diacyl glycérol (DAG) et la réponse calcique (Ca^{++}).
- L'adénylate cyclase responsable de la régulation du taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc)
- Les phosphorylations des protéines sur des résidus Sérine/Thréonine et Tyrosine.

5.1 LA VOIE DE LA PHOSPHOLIPASE C

Cette voie est une voie ubiquitaire utilisée par de nombreux ligands et récepteurs. L'importance des phospholipides dans ces mécanismes de transduction a été mise en évidence pour la première fois en 1953 par Hokin et Hokin.

a) *Schéma général*

Au repos les phospholipases C (PLC) sont essentiellement cytosoliques nécessitant lors de l'activation une translocation membranaire. Dans la membrane, la phospholipase C activée clive le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en deux molécules (Guillemette, 1989):

- L'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3).
- Le diacylglycérol (DAG).

L'IP3 et le DAG ainsi formés peuvent migrer dans le cytoplasme et véhiculer l'information (Berridge et Irvine, 1989).

Le DAG active la protéine kinase C (PKC) en augmentant son affinité pour

le calcium et les phospholipides. La PKC activée catalyse la phosphorylation de nombreuses protéines au niveau des résidus sérine et thréonine.

L'IP3 est un isomère actif portant des groupements phosphate sur les positions 1, 4, et 5 de la molécule. L'IP3 induit le relargage de calcium à partir de réserves intracellulaires contenus dans le réticulum endoplasmique.

L'action de la phospholipase C peut être mimée dans la pluspart des modèles cellulaires par deux familles de molécules:

- les esters de phorbol comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA)
- des ionophores à Ca⁺⁺ comme la ionomycine ou la molécule A23187.

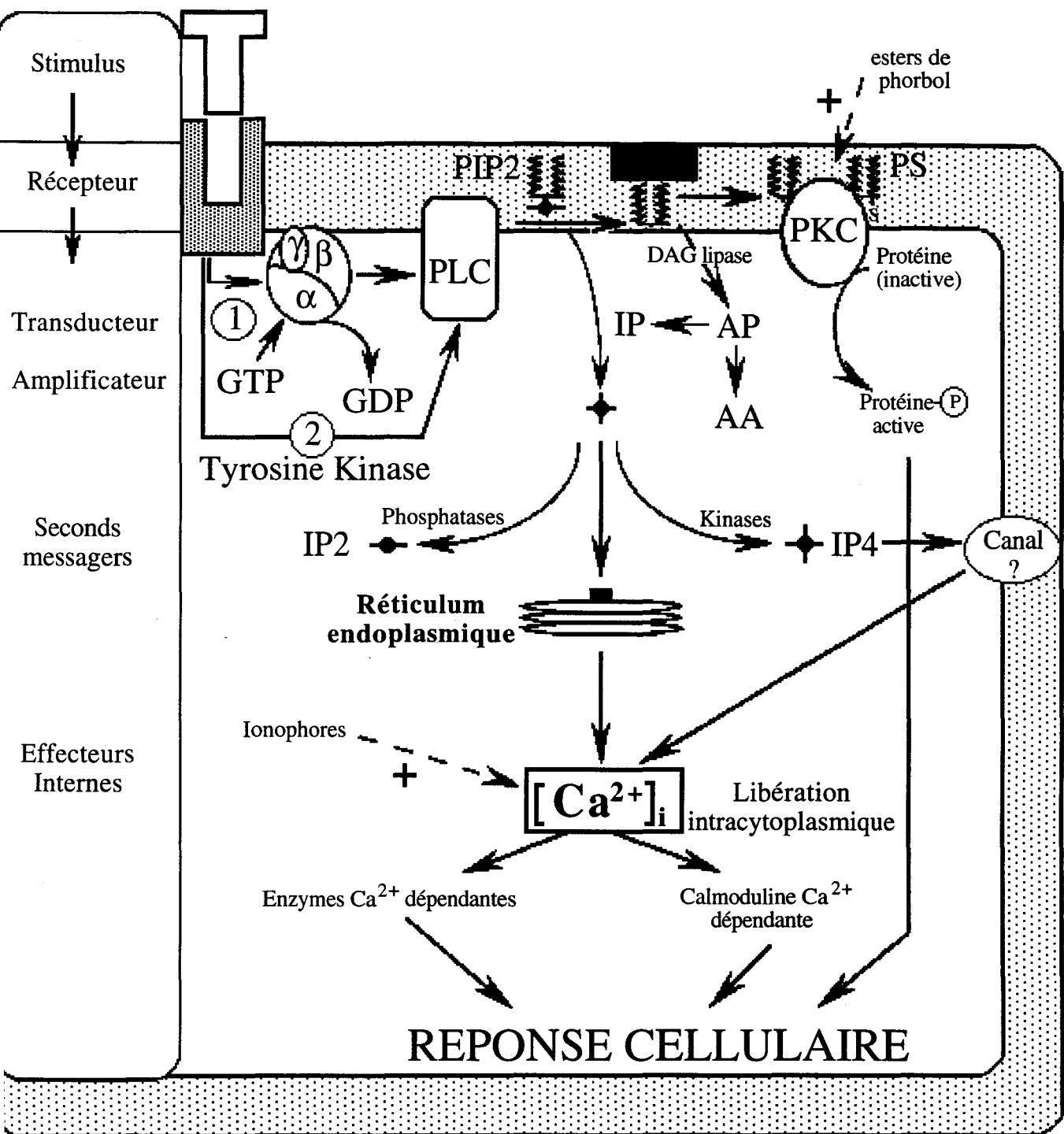
Ils agissent comme des analogues structuraux du DAG activant ainsi directement la PKC.

b) *Les phospholipases C*

Il existe une dizaine d'isoformes de la PLC (Majerus *et al.*, 1990) regroupées en 4 types α , β , γ , δ codés par des gènes distincts. Ces formes contiennent des régions homologues à des séquences de l'oncogène Src dénommées SH2 et SH3. Elles correspondent à des domaines régulateurs de nombreuses tyrosines kinases. En outre, ces isoformes présentent toutes les mêmes spécificités de substrat. Elles peuvent hydrolyser le phosphatidylinositol (PI), le phosphoinositol 4 (PI(4)P) et le PI(4,5)P₂ (Koch *et al.* 1991; Robinson, 1991).

c) *Les protéines kinases C*

Après activation de la PLC, on observe une translocation de la PKC du cytosol à la membrane qui correspond à la liaison de la PKC activée à des récepteurs membranaires. Cette liaison est dépendante du calcium et de la phosphatidylsérine et semble faire intervenir des éléments du cytosquelette. Il existe de nombreuses isoformes de la PKC qui présentent des activités et des localisations cellulaires distinctes (Nishizuka 1984, 1988). Toutes cependant possèdent un domaine de régulation et un domaine catalytique. Ce dernier est actif de façon constitutive comprenant les sites de fixation de l'ATP et de son substrat. Quant au domaine de régulation, celui-ci comporte les domaines de fixation pour le DAG ou les esters de phorbol. De plus, ces isoformes de la protéine kinase C catalysent la phosphorylation de protéines sur des résidus sérine et thréonine mais présentent des différences dans leur réponse au calcium et au DAG. Au niveau du lymphocyte T (Lucas *et al.*, 1990), il y a expression



VOIE DE LA PHOSPHOLIPASE C

essentiellement des isotopes α , $\beta 1$, et $\beta 2$ et ce, à des taux variables. Toutefois les isotopes semblent pouvoir se localiser dans des compartiments intracellulaires différents dans la même cellule.

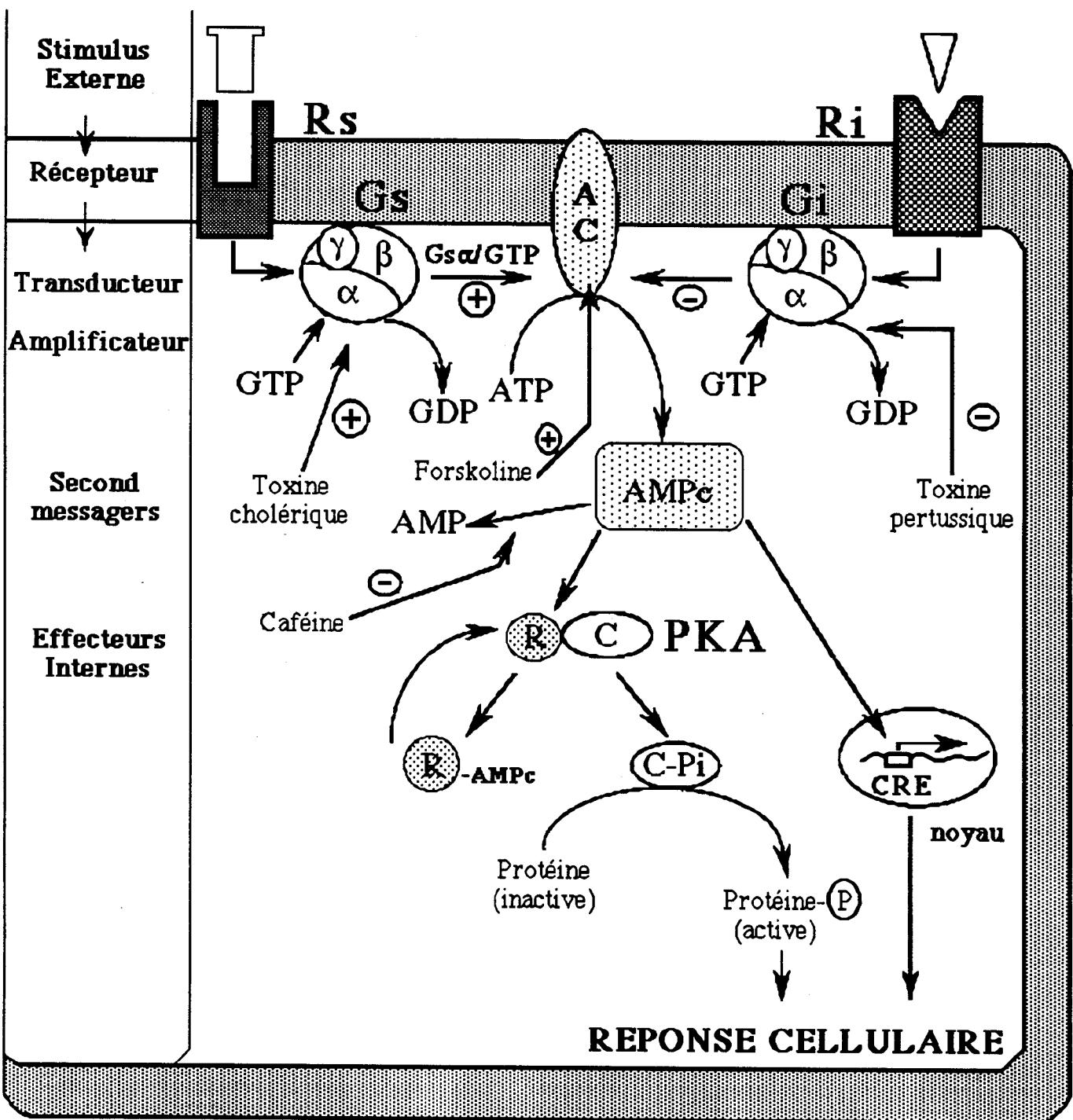
d) *L'inositol triphosphate et la réponse calcique.*

L'IP3 est produit par hydrolyse du PIP2 par la PLC, entraînant une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{++} , mobilisant les stocks internes provenant du réticulum endoplasmique. Le calcium se fixe sur des récepteurs spécifiques formés par un homotétramère composé de quatre sous-unités identiques ayant un site de fixation pour l'ATP et l'IP3. Au repos, les cellules régulent leur taux de calcium intracellulaire qui est d'environ mille fois inférieur à celui présent dans le milieu extérieur. La stimulation antigénique ainsi que des anticorps dirigés vis-à-vis de molécules telles que le récepteur T, la molécule CD2 ou la molécule CD3 entraînent une augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Le calcium intervient comme co-activateur allostérique de la PKC, il agit également complexé sur des calciprotéines telle que la calmoduline qui stimule certaines kinases.

Le calcium apparaît donc comme une composante essentielle à l'activation cellulaire mais cependant insuffisante pour l'obtention d'une activation optimale des cellules T. Le point important de la réponse semble être l'augmentation soutenue et prolongée du calcium plutôt qu'un simple pic initial lié à la mobilisation des réservoirs endogènes. Outre cet influx de calcium intracellulaire, il existe également une entrée de calcium extracellulaire. Cependant, s'il existe sur de très nombreuses cellules des canaux calciques, au niveau des lymphocytes T, ceux-ci ne semblent pas être présents, même si une conductance calcique de faible amplitude a été mesurée au niveau de ces cellules.

5.2 LA VOIE DE L'ADENYLATE CYCLASE, LES PROTEINES G ET L'AMP CYCLIQUE

Autre système de couplage des récepteurs avec les effecteurs cellulaires est celui de l'adénylate cyclase. L'importance de cette voie dans le système immunitaire a été démontré dès 1974 (Bourne *et al.*, 1974). La stimulation de ces récepteurs transmet un signal qui peut inhiber de nombreuses fonctions des cellules T telles que la prolifération et la sécrétion d'interleukine IL-2.



VOIE DE LA PROTEINE KINASE A

a) *Les Protéines G*

La fixation d'un ligand sur son récepteur couplé à l'adénylate cyclase entraîne dans un premier temps l'activation de protéines G subdivisées en deux grands groupes: les grandes et les petites protéines G (Gilman, 1987; Cantrell, 1994).

- Les grandes protéines G (Simon *et al.*, 1991) sont formées de protéines hétérotrimériques α , β , γ . Elles existent sous la forme d'un complexe $\alpha\beta\gamma$ inactif au repos. A la suite d'un changement de conformation de la sous-unité α , laquelle fixe le GDP, une molécule de GTP vient la remplacer. Dès lors, le complexe $\alpha\beta\gamma$ se dissocie en α/GTP et $\beta\gamma$. C'est la forme α/GTP qui porte la fonction effectrice, GTPasique. Si les sous-unités β et γ sont assez monomorphes, sur la base de la sous-unité α , 4 familles de protéines G ont pu être distinguées. Les stimulatrices (Gs), les inhibitrices (Gi), les stimulatrices de la PLC (Gq) et celles de la famille G12.

- Les petites protéines G (Hall, 1990) concernent trois familles et un facteur d'elongation EF-Tu: la famille des protéines oncogéniques ras, la famille des protéines Rho (Rho A, B et C) dont font également partie les protéines Rac (Rac 1 et 2) et la protéine TC10 et enfin la famille des protéines Rab (Rab 1 et 2) incluant les protéines SEC4 et YPT1.

b) *L'adénylate cyclase*

L'adénylate cyclase (AC) est une enzyme de conversion de l'ATP en AMPc qui contrôle les taux d'AMPc dans la cellule, transmembranaire, elle est activée après fixation du ligand à son récepteur par les protéines G qui inhibent (Gi) ou activent (Gs) son fonctionnement.

c) *L'AMP cyclique*

L'AMPc agit en se fixant sur son récepteur intracellulaire, la protéine kinase A (PKA) AMPc-dépendante (Taylor, 1989). La PKA est une Ser/Thr kinase dont la découverte a mis en évidence le rôle prépondérant des phosphorylations dans le métabolisme cellulaire. Deux isotypes de cette enzyme ont été décrits, tous deux possédant une sous unité catalytique commune et une sous-unité régulatrice distincte. Suite à la fixation de l'AMPc sur la sous-unité régulatrice il y a dissociation du complexe dont les parties catalytiques peuvent fixées dès lors l'ATP.

Entre ces différentes voies, il existe un haut degré d'interrelation encore

très mal connu. Ainsi, pour exemple la PKC peut inhiber la voie de la PKA tandis qu'inversement la stimulation de l'adénylate cyclase diminue l'activité de la PKC cytosolique. De plus, il existe des interactions entre la voie de la PKC et celle de la phospholipase A2. Quant à l'AMPc il a été impliqué dans de nombreux systèmes cellulaires de rétrocontrôles négatifs pouvant réguler des voies comme la PLC.

5.3 LES PHOSPHORYLATIONS PROTEIQUES

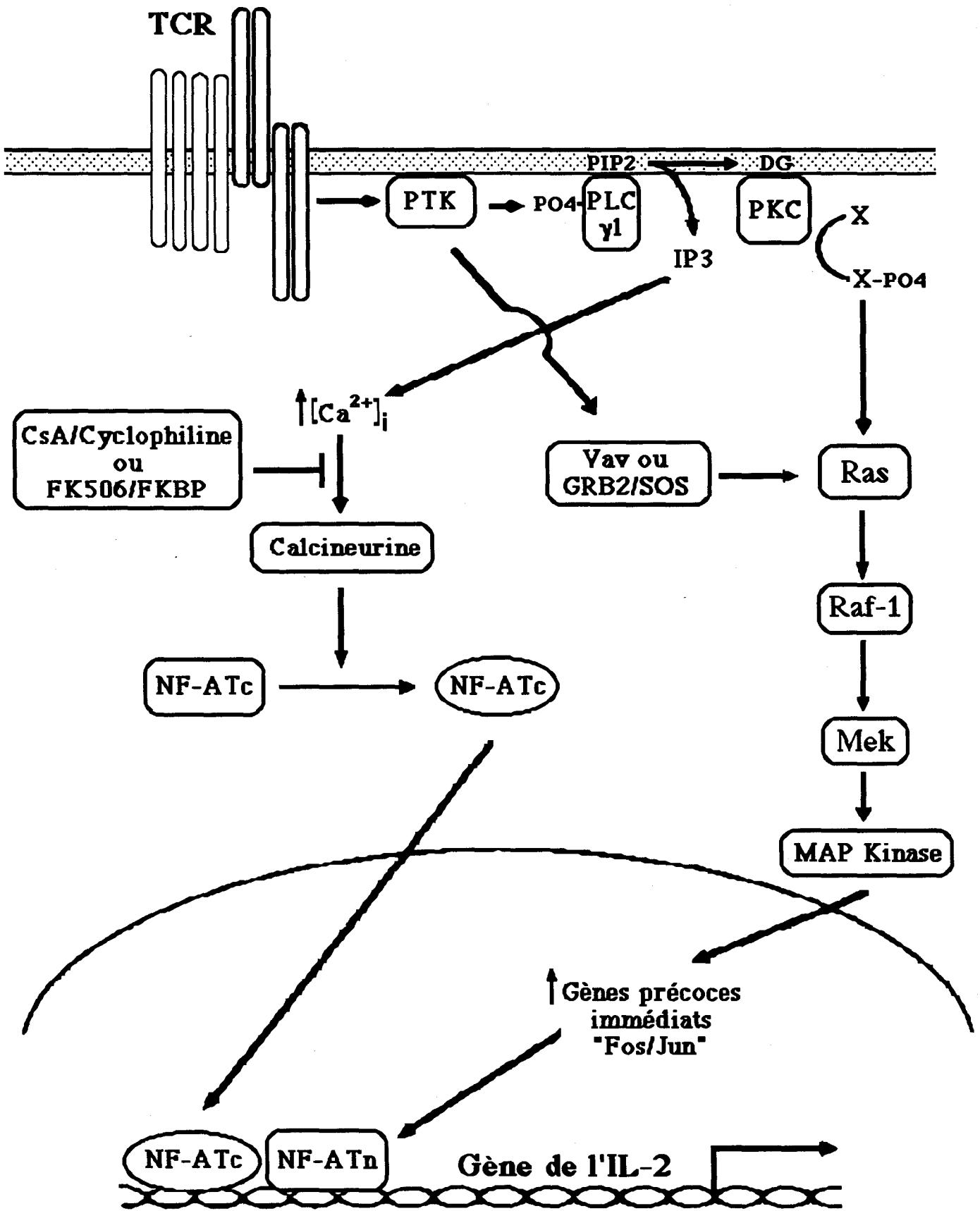
Enfin, il existe un autre grand type de relais de l'activation cellulaire, celle de la phosphorylation des protéines (Isakov, 1993; Finkel *et al.*, 1991; Brown, 1993). Les protéines cellulaires peuvent être phosphorylées sur des résidus sérine (Ser) et thréonine (Thr) qui représentent plus de 98% des phosphorylations dans une cellule normale, ou sur des résidus tyrosine (Tyr). La phosphorylation sur les résidus Thr et Ser est catalysée entre autre par les PKC. La stimulation par le complexe CD3/TCR induit l'activation de la Ser/Thr kinase raf-1, d'un proto-oncogène ainsi que de la MAP-2 kinase (Microtubule-Associated Protein 2 kinase). D'autre part, après stimulation par des anticorps dirigés vis-à-vis de la molécule CD3, des phosphorylations sur des résidus Tyr sont observables après 5 secondes et ce, bien avant l'activation de la PLC (environ 30 secondes). Deux protéines tyrosines kinases se trouvent être en effet associées au complexe TCR à savoir la p56^{lck} et la p59^{fyn} décrites précédemment (Rudd *et al.*, 1994).

5.4 CONSEQUENCES GENIQUES DE L'ACTIVATION CELLULAIRE

L'activation des protéines cytoplasmiques aboutit à l'activation de protéines nucléaires (Crabtree, 1989) qui modifient le niveau de transcription de certains gènes en se fixant à leur région enhancer. Ces gènes ont été classés en trois groupes: les gènes immédiats, les gènes précoce et les gènes tardifs.

a) *Les gènes "immédiats"*

L'expression de ces gènes débute dans les minutes qui suivent l'activation lymphocytaire. Leur expression n'est pas bloquée par les inhibiteurs de la synthèse protéique tels que la cycloheximide. Ce groupe de gènes contient principalement des gènes transactivateurs dont certains sont des proto-oncogènes qui vont activer l'expression de gènes plus tardifs.



c-Fos qui est un proto-oncogène, complexé à c-Jun, se fixe aux sites AP1 des régions enhancer de certains gènes. Son niveau d'expression est multiplié par 100 et débute 15 minutes après l'activation.

NFAT-1 qui est un transactivateur, active en particulier l'expression du gène de l'interleukine 2.

c-Myc qui est également un proto-oncogène.

NFkB, initialement décrit lors de l'activation des gènes des chaînes légères des immunoglobulines Kappa, active la transcription de nombreux autres gènes.

b) Les gènes précoces

Leur expression est bloquée par la cycloheximide, elle débute entre 30 minutes et 24 heures après le début de l'activation. On trouve dans le groupe des gènes précoces les gènes codant pour de nombreuses cytokines comme l'interferon γ , l'interleukine 2 et son récepteur, les interleukines 3, 4, 5 et 6 et le GM-CSF. Ce groupe comprend également des gènes codant pour des protéines comme Bcl-2 ou la cycline qui jouent un rôle dans le déclenchement de la mitose.

c) Les gènes tardifs

Leur expression débute 24 h après l'activation et s'étend sur deux semaines. Ce groupe comprend les récepteurs membranaires du groupe des "Very Late Antigens": VLA 1, VLA 2, VLA 3, VLA 4 et VLA 5, il comprend également la molécule d'histocompatibilité de classe II.

LES CYTOKINES ET LEURS RECEPTEURS

Les réponses immunitaires sont la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types de cellules qui communiquent entre elles par l'intermédiaire de facteurs solubles appelés "cytokines". Ce n'est en fait que dans les années 1960 qu'a émergé le concept que des médiateurs solubles peuvent représenter le support moléculaire de la coopération cellulaire. La première interleukine (IL-1) a été clonée en 1984.

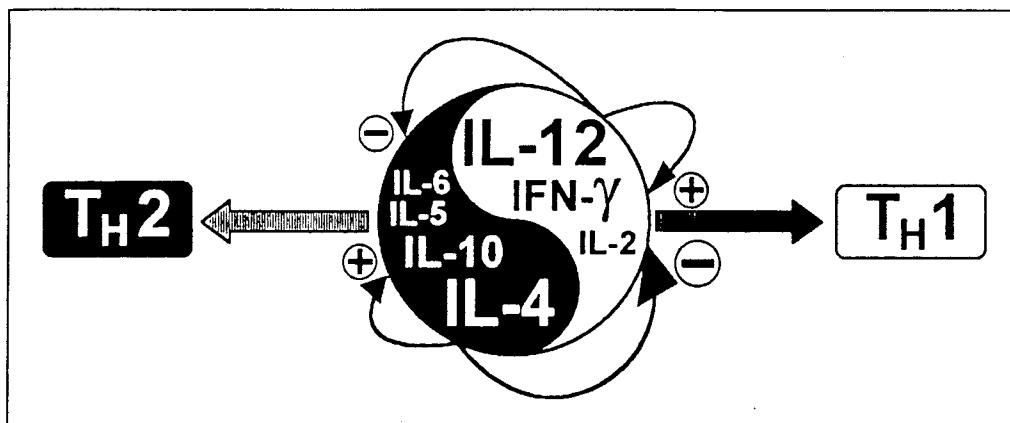
Médiateurs de la communication intercellulaire, les cytokines sont de petites protéines synthétisées par des cellules activées. Elles peuvent agir directement au niveau local (de façon autocrine ou paracrine), sans passer nécessairement par le courant sanguin pour atteindre leur cible (action endocrine).

A cette définition correspond une multitude de molécules qui interviennent dans la réponse immunitaire, dans l'hématopoïèse, dans les réactions inflammatoires, la cicatrisation, le fonctionnement neuronal, etc. La même molécule peut - et c'est même la règle générale - exercer des fonctions variées dans plusieurs domaines.

Les cytokines régulent l'intensité et la durée de la réponse immunitaire, en stimulant ou en inhibant la croissance et la différenciation des différentes cellules impliquées, et en modulant la sécrétion d'autres cytokines, elles sont le *Ying et le Yang* de la réponse immune.

Il serait donc vain de vouloir présenter ici l'ensemble des données sur les cytokines, la dernière en date publiée et répertoriée comme telle est l'interleukine 15, un facteur apparenté à l'interleukine 2. C'est pourquoi, j'ai délibérément choisi certaines de ces cytokines pour leur rôle dans l'établissement du répertoire T et pour leur sécrétion différentielle en sous population TH1 et TH2 (Bottomly, 1988; Scott, 1993).

| Cytokines | Protéine | kDa | Chromosomes | Cellules sécrétrices |
|---------------|----------|-------|-------------|-------------------------------------------------------|
| IL-1a | 159 | 17.5 | 2q12-21 | Cellules T/B; Monocytes; Cellules dendritiques; |
| IL-1b | 153 | 17.3 | 2q13-21 | Fibroblastes; Granulocytes; Astrocytes; Kératinocytes |
| IL-2 | 133 | 15-20 | 4q26-27 | Lymphocytes T |
| IL-3 | 133 | 14-30 | 5q23-32 | Lymphocytes T; Basophiles; Mastocytes |
| IL-4 | 129 | 15-19 | 5q23-31 | Lymphocytes T; Basophiles; Mastocites |
| IL-5 | 115 | 45 | 5q23-31 | Lymphocytes T; Basophiles; Eosinophiles; Mastocytes |
| IL-6 | 184 | 26 | 7q21 | Cellules T/B; Monocytes; Fibroblastes; |
| IL-7 | 152 | 20-28 | 8q12-13 | Cellules stromales de la moelle osseuse |
| IL-8 | 77 | 6 | 4q12-21 | Cellules T; Monocytes; Fibroblastes; Kératinocytes |
| IL-9 | 126 | 20-30 | 5q23-31 | Lymphocytes T |
| IL-10 | 160 | 18 | 1 | Lymphocytes T/B; Monocytes |
| IL-11 | 179 | 23 | 19 | Fibroblastes; Cellules stromales de la moelle osseuse |
| IL-12a | 306 | 40 | | Monocytes; Cellules NK |
| IL-12b | 197 | 35 | | |
| IFNg | 143 | 40-70 | 12q24 | Lymphocytes T |



PROPRIÉTÉS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES CYTOKINES

6.1 INTERLEUKINE 2

L'interleukine 2 (IL-2) identifiée pour la première fois en 1975 joue un rôle majeur au sein du système immunitaire. Son spectre d'activité s'étend des cellules T, aux cellules B, aux cellules Natural Killer (NK), aux cellules Lymphokine-Activated killer (LAK), aux monocytes, aux macrophages ou encore aux oligodendrocytes (Smith, 1988).

L'IL-2 est une glycoprotéine de 15.5 kDa produite par les cellules T activées ou plus exactement une sous population T dénommée TH1. L'IL-2 humaine a 70% d'homologie avec l'IL-2 murine. Les structures primaires et tridimensionnelles de cette molécule sont aujourd'hui connues et présentent de grandes homologies entre espèce d'où la possibilité de réactions croisées. Plusieurs éléments régulateurs agissant en *cis* ont pu être identifiés tels que NFAT-1, NF-kB, AP-1. En outre l'expression du gène est contrôlé à un niveau post-transcriptionnel impliquant une instabilité du messager.

Le récepteur à l'interleukine 2 (Waldmann, 1989) est constitué d'un complexe moléculaire de haute affinité formé de l'association de deux protéines membranaires: une chaîne α de 55 kDa dénommée IL-2R α , P55 ou Tac et une chaîne β de 70-75 kDa appellée IL-2R β ou P70. Cependant chacune des chaînes α et β est capable de fixer IL-2.

La chaîne α absente sur les cellules T au repos, apparaît après activation. Quoique essentiellement extracellulaire cette protéine présente une région intracytoplasmique trop courte pour servir de molécule transductrice. La chaîne β a été décrite à la suite d'observations montrant d'une part que l'interleukine 2 pouvait agir sur des cellules n'exprimant pas la chaîne α et d'autre part par la démonstration qu'un anticorps anti-interleukine 2 récepteur (TAC) n'empêchait pas l'IL-2 d'agir. A la différence de la chaîne α qui ne présente qu'une courte région intracytoplasmique, la chaîne β en possède une de 286 AA, riche en proline et en sérine avec une prépondérance de résidus chargés négativement. Constitutivement exprimée à la surface des cellules T, en particulier sur les cellules CD8 et inducible sur les cellules CD4, elle peut fixer l'interleukine 2 avec une affinité moyenne. Ainsi, on admet généralement qu'il existe trois formes capables de fixer l'IL-2: IL-2R α , IL-2R β et le complexe formé des deux chaînes α et β ayant respectivement pour affinité:

Kd α : 10-20 nM, Kd β : 0.5-1 nM et Kd $\alpha\beta$: 10-50 pM.

En outre, intervient une troisième chaîne réellement transductrice du signal, retrouvée également pour d'autres récepteurs tels que les récepteurs pour l'IL-4

ou l'IL-7.

6.2 L'INTERLEUKINE 3

L'interleukine 3 est une lymphokine des plus pléiotropiques. En effet, elle peut stimuler et induire la différenciation de nombreuses cellules telles que les macrophages, les basophiles, les mégacaryocytes, à l'exception toutefois des cellules T et B. Cette protéine est une glycoprotéine très fortement glycosylée. Elle est produite essentiellement par les cellules T activées, TH1 ou TH2, et par les cellules mastocytaires. Son récepteur est de faible affinité puisque le Kd est de 17.9 nM. Il présente cependant une certaine homologie avec le récepteur humain, ainsi que d'autres récepteurs apparentés tels que le GM-CSF ou le G-CSF. Une molécule dénommée gp130 sert de molécule transductrice. L'IL-3 entraîne au niveau cellulaire une translocation de la PKC du cytoplasme à la membrane. Elle entraîne en outre une rapide phosphorylation des protéines au niveau des résidus tyrosines.

6.3 L'INTERLEUKINE 4

L'IL-4, identifiée en 1982 sur sa capacité à induire la prolifération des lymphocytes B.a été depuis cette date, une des lymphokines des plus étudiées. Quoique spécifique d'espèce, on retrouve jusqu'à 50% d'homologie dans certaines régions entre les molécules humaine et murine.

Outre les cellules T auxiliaires, plus précisément une sous-population dénommée TH2, les cellules mastocytaires, les cellules de la moelle osseuse de même que les cellules B sont capables de produire de l'IL-4 (Yokota *et al.*, 1988).

IL-4 a un rôle majeur dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules B. Elle entraîne l'expression des molécules codées par le CMH de classe II, des molécules LFA-1 et LFA-3 et augmente très fortement l'expression de la molécule CD23 (récepteur IgE de faible affinité). A l'inverse, elle entraîne une diminution des molécules CD5 et CD32/Fc δ RII. L'IL-4 augmente l'expression à la surface des cellules B des IgM et de la molécule CD40 (molécule cruciale dans la prolifération et la différenciation des cellules B), la molécule B7, dont le récepteur est la molécule CD28 exprimée par les cellules T. Cette augmentation d'expression des molécules de surface explique probablement pourquoi IL-4 augmente l'aggrégation B-T. De plus, elle entraîne une production de TNF et d'IL-6 par les cellules B.

Si les IFN α et γ peuvent bloquer l'effet de l'IL-4 sur les cellules B, il n'en

n'est pas de même sur toutes les cellules. En réponse à l'IL-4, les cellules B se différencient en plasmocytes sécrétaires d'anticorps d'isotypes IgE, IgG1, IgG4. Toutefois, les interférons IFN α et γ inhibent cet effet conduisant à une synthèse accrue des IgG2a. Paradoxalement, *in vitro*, l'IL-4 inhibe la synthèse des immunoglobulines par les cellules B préalablement activées par le Pokeweed (PWM). Elle agirait de manière indirecte, et ce sur les monocytes.

Au niveau thymique, l'IL-4 agirait de façon prépondérante sur l'ontogénie T, et plus particulièrement sur les cellules doublement négatives CD4-CD8-. Quant au niveau des cellules T matures, l'IL-4 entraîne une différenciation préférentielle des cellules T de sous-type Th2.

Au niveau des monocytes, l'IL-4 augmente l'expression de CD23 mais à l'inverse diminue l'expression de trois types de récepteurs aux immunoglobulines: - RI (CD64); - RII (CD32); - RIII (CD16). L'IL-4 bloque la synthèse de l'IL-1, de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF α ainsi que celle du PGE2 mais stimule la synthèse du facteur C2 du complément et celui du PAF. L'IL-4 stimule les fibroblastes tandis que les cellules épithéliales et endothéliales expriment le récepteur.

Le récepteur est formé d'une seule classe dite de haute affinité (K_d 40-120pM), exprimé à la surface de toutes les cellules testées à ce jour en faible nombre (100-1000 par cellules). Ce récepteur présente des homologies avec le domaine extracellulaire de IL2 (p70) et comporte un long domaine cytoplasmique (Mosley *et al.*, 1989).

6.5 INTERLEUKINE 5

L'IL-5 est une molécule produite par les cellules T, plus particulièrement les cellules TH2, et les eosinophiles. Formé par un homodimère relié par un pont disulfure, l'IL-5 induit une augmentation des eosinophiles et ce de concert avec IL-3 et le GM-CSF. L'IL-5 agit sur les étapes de différenciations tardives des eosinophiles. C'est également un facteur tardif de différenciation des cellules B agissant sur la synthèse préférentielle des IgA. L'IL-4, le TGF β et l'IL-5 agissent en synergie (Yokota *et al.*, 1988; Moller, 1988).

Le récepteur présente deux formes, une de haute affinité (K_d 66 pM) et l'autre de faible affinité (K_d 12nM), composées de deux chaînes, une de fixation (60 kDa) et l'autre de transduction (gp130).

6.6 INTERLEUKINE 9

Cette lymphokine est un facteur de croissance T (Uyttenhove, 1988) mais également stimulatrice des cellules mastocytaires. L'IL-9 n'est pas exprimé de manière constitutive par les cellules T, mais résulte d'une activation cellulaire (Quesniaux, 1992). IL-2 semble être un facteur nécessaire à l'expression de l'IL-9, et entraîne la prolifération de lignées T à long terme voire même *in vivo*. Elle agit en synergie avec IL-4 pour promouvoir la prolifération de clone TH2 mais n'a aucune action sur des cellules T naïves. En outre, IL-9 agit sur les thymocytes.

IL-9 module la réponse IgG et IgE par les cellules B en présence de concentrations suboptimales d'IL-4. Au niveau des progéniteurs erythropoïétiques CD34+, ceux-ci sont sensibles à l'action de l'IL-9.

6.7 INTERLEUKINE 10

L'IL-10 de souris est un homodimère d'un poids moléculaire de 35-40 KDa, et partage environ 70% d'homologie avec la protéine humaine mais également à une protéine dénommée BCRF-1 (15kDa) codée par le virus d'Epstein-Barr (EBV). Découverte sur la base de son activité inhibitrice de l'activation cellulaire T (Fiorentino *et al.*, 1989; Moore *et al.*, 1990), elle est produite par les cellules B et accessoires et une sous population de cellules T appellée TH2.

Elle inhibe la production d'interleukines IL-2, IL-3, TNF, IFN γ et GM-CSF par les TH1 en réponse à l'antigène. Elle inhibe également la production d'IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et de TNF α par les monocytes. Elle induit l'expression des molécules de CMH de classe II sur les cellules B et les diminue sur les cellules monocytaire. Elle diminue en outre l'expression de la molécule B7 d'où un rôle prépondérant dans l'établissement de la réponse immunitaire (Mosmann et Moore, 1991; D'Andrea *et al.*, 1993; O'Garra et Murphy, 1994).

IL10 est un facteur agissant sur la croissance des cellules B et leur différenciation, elle augmente la viabilité des cellules B à l'image de l'IL-4. IL-10 coopère avec le TGF β pour induire la synthèse d'IgA à partir de cellules B naïves en présence d'anticorps anti CD40 fixé à la surface de cellule présentatrice du type dendritique.

6.8 INTERLEUKINE 12

L'interleukine 12 aussi dénommée NKSF (Natural Killer Cell Stimulating Factor) ou CLMF (Cytotoxic Lymphocyte Maturator Factor), est un

hétérodimère glycosylé d'un poids moléculaire de 75 KDa, lié par un pont disulfure. La sous unité de 35 kda (p35) possède des homologies avec l'IL-6 et le GM-CSF tandis que la seconde sous unité (p40) démontre des similitudes avec le récepteur soluble de l'IL-6. L'expression de la chaîne p35 s'avère être amplifiée par l'expression simultanée de la chaîne p40 (Kobayashi *et al.*, 1989; Wolf *et al.*, 1991).

IL-12 a de nombreuses activités à la fois sur les cellules NK et sur les cellules T. Elle amplifie la croissance des cellules NK, CD4⁺ et CD8⁺ activées et augmente l'ADCC ainsi que l'activité cytotoxique médiée par les cellules NK. Elle contribue à l'activation des cellules macrophagiques à travers la synthèse d'IFN γ .

IL-12 peut induire le développement des cellules TH1 augmentant la synthèse IFN γ (Seder *et al.*, 1993). En outre, l'administration d'IL-12 *in vivo* au cours d'infections cutanées causées par *Leishmania vigor* permet le développement de cellules TH1 secrétrices d'IFN γ et permet ainsi une protection (Sypek *et al.*, 1993). Cette protection médiée par l'IL-12 a été également observée lors d'une infection par *Toxoplasmosis gondii*. Au cours de l'infection par VIH, une diminution de la sécrétion de l'IL-12 a été observée, susceptible de rendre compte d'une partie de la dysrégulation cellulaire (O'Garra et Murphy, 1994).

Le récepteur à l'IL-12 a été isolé à partir de cellules lymphocytaires activées par la PHA, et est estimé à 110 kDa dont le Kd est estimée à 50-150 pM (Truitt *et al.*, 1991).

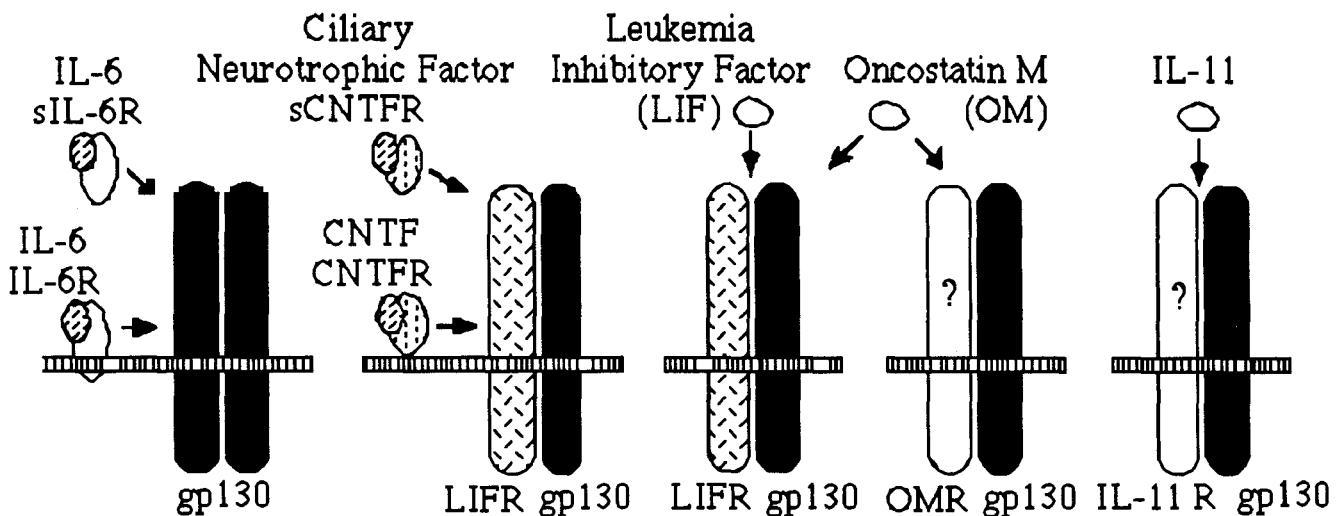
6.9 INTERFERON γ :

L'IFN γ diffère significativement des deux autres interférons α et β . D'un poids moléculaire de 20-25KDa, il existe 40% d'homologie entre les interférons γ humain et murin. A l'inverse des IFN α et β qui sont produits par un grand nombre de cellules , l'IFN γ est spécifiquement produit par les cellules T. Ainsi, les cellules T productrices d'IFN γ sont d'une part les cellules dites cytotoxiques/suppressives de phénotypes CD8 ainsi que les cellules CD4 de sous type TH1 et les cellules NK.

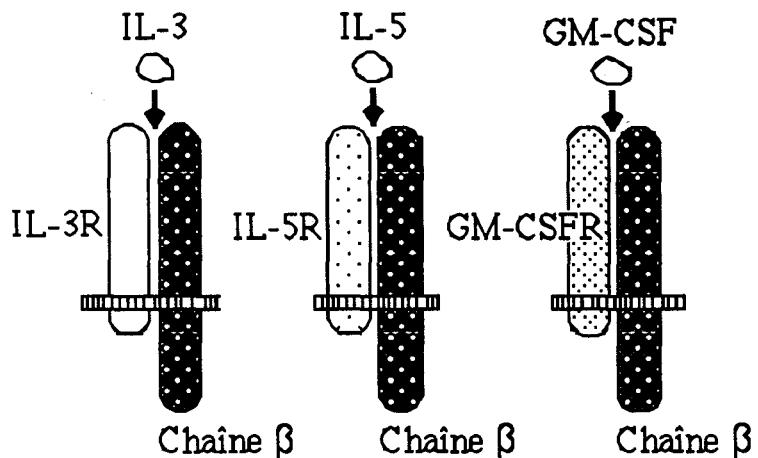
Un des principaux effets de l'IFN γ comme de celui des différents interférons est celui de la modulation d'expression des molécules de CMH entraînant leur augmentation à la surface des cellules monocytaires mais également sur d'autres cellules telles que les cellules B, les cellules T, et les cellules endothéliales. L'expression de la molécule MAC-1 est influencée par l'IFN γ et stimule son expression. Il induit également la synthèse et le relargage

par les cellules monocytaires de TNF, ainsi qu'une molécule à l'activité tumorigène appelée MAF. L'IFN γ intervient également sur la prolifération et la différenciation des cellules B activées puisque capable d'inhiber l'action de l'IL-4.

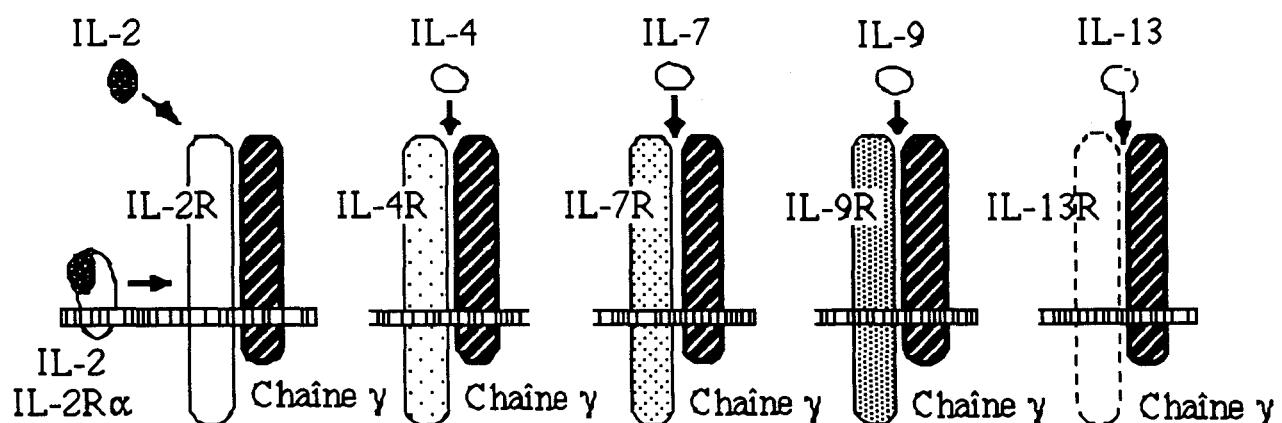
Molécule gp130 Transductrice



Chaîne β Transductrice



Chaîne γ Transductrice



Récepteur aux cytokines

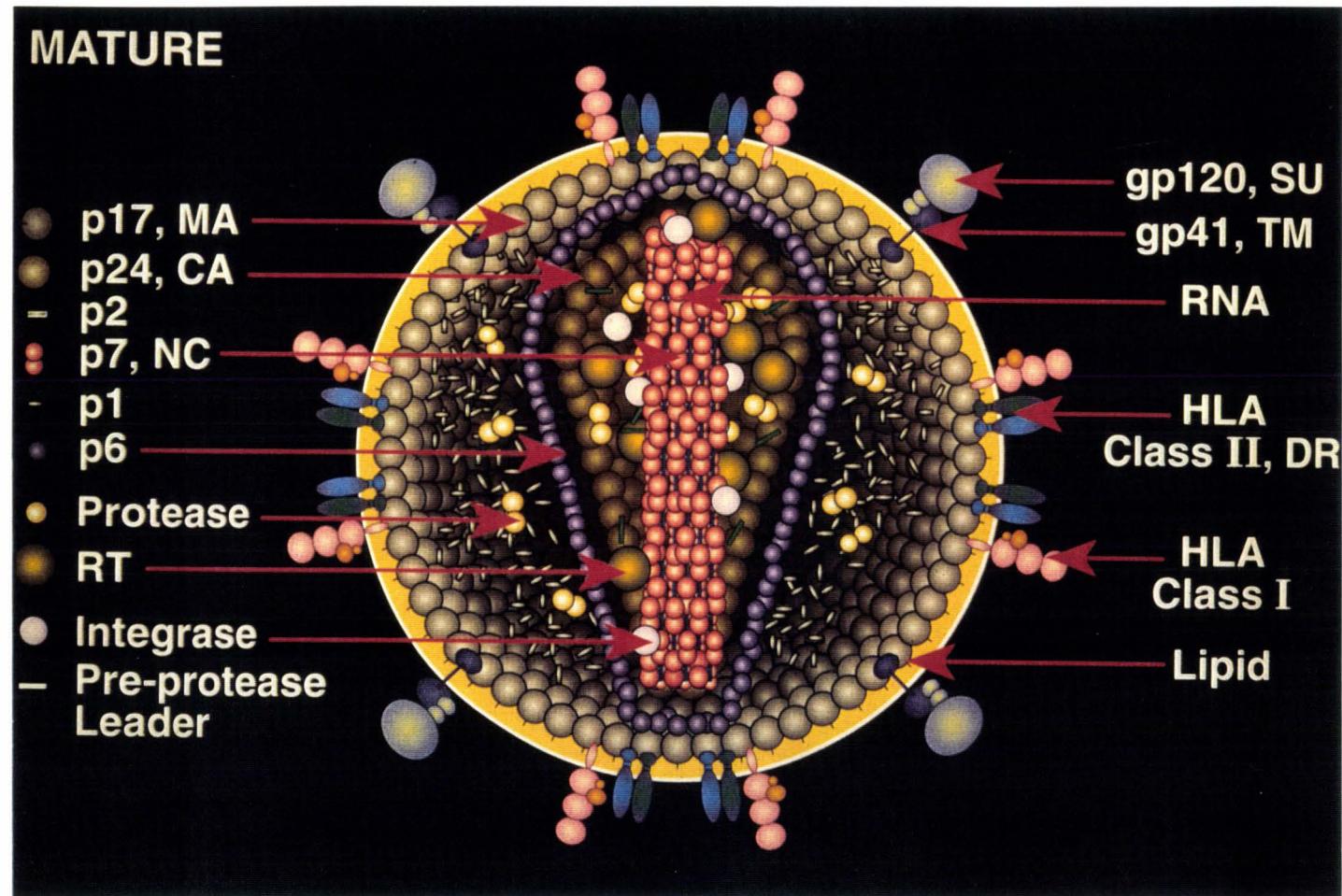
LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

Au cours de l'année 1980 à Los Angeles trois nouvelles personnes souffrant de fortes fièvres présentèrent une perte de poids associée à des mycoses avant de développer une pneumocystose. Hasard? Tous sont jeunes et homosexuels. Le docteur M. Gottlieb se décide en 1981 à alerter le centre de contrôle des maladies (CDC) à Atlanta. L'enquête qui en découle révèle en août 1981, l'existence de 108 malades dont 47 atteints du sarcome de Kaposi, 54 de pneumocystose, 7 souffrant des deux affections. En France, les premiers cas sont recensés et présentent les mêmes signes cliniques. Dès lors, nul doute n'est permis, il existe un nouvel agent infectueux responsable de ces manifestations pathologiques.

Depuis ces premières descriptions, le Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise (SIDA) n'a cessé de s'étendre et est devenu en cette fin de siècle la première pandémie touchant l'ensemble des cinq continents. Cette maladie qui touche aussi bien les pays occidentaux que les pays en voie de développement, représente, aujourd'hui, un problème de santé publique mondiale. Selon les estimations de l'OMS, c'est plus de 10 millions de personnes actuellement infectées (28497 cas dont 57% sont décédés au 31 décembre 1993 en France), et susceptibles de mourir dans les dix années à venir.

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), agent étiologique du SIDA est capable d'infecter un grand nombre de cellules à la fois nerveuses et immunitaires. L'infection par le VIH se traduit par une perte progressive des défenses immunes dont les manifestations cliniques sont: l'apparition d'infections opportunistes (pneumocystose, tuberculose, toxoplasmose), le développement de maladies cancéreuses comme le sarcome de Kaposi et des troubles neurologiques. Cette évolution lente et progressive se termine par la mort de l'individu.

Le virus se transmet par voie sexuelle, 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. La transmission a longtemps été limitée aux groupes à risques que sont les homosexuels, les toxicomanes intraveineux, les hémophiles et les polytransfusés (avant 1986, suite aux nouvelles directives quant à l'utilisation des produits sanguins) ainsi qu'à leurs partenaires sexuels et qu'aux enfants nés de mères infectées. Désormais, la contamination représentant le plus de nouveaux cas est celle par contamination hétérosexuelle et ce malgré les efforts déployés pour l'information et la prévention. Quant aux vaccins, force est de constater que malgré tous les investissements qui y ont été consacrés, le monde scientifique demeure encore impuissant face à ce fléau.



LA PARTICULE VIRALE: VIH

LA NATURE DU VIH

La famille des rétrovirus est divisée en trois sous-groupes définis selon des critères de pathogénicité (Bendinelli et Ceccherini-Nelly, 1988).

- *Les Oncovirus à ARN:* Ces virus sont très répandus dans le monde animal; ils provoquent des tumeurs et des leucémies. HTLV-I et HTLV-II (Human T cell Leukaemia Virus) appartiennent à ce groupe. Chez l'animal des virus apparentés ont été identifiés tels que le STLV (Simian T cell Leukaemia Virus), le BLV (Bovine Leukaemia Virus) et le FeLV (Feline Leukaemia Virus).

- *Les Lentivirus:* Parmis ces virus, on connaît le virus Visna du mouton, le virus de la chèvre (CAEV) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Le VIH fait partie de ce groupe dont l'infection se caractérise par une évolution lente de la maladie. Le VIH est un rétrovirus à ARN, dénommé initialement LAV (LymphAdenopathy-associated Virus), HTLV-III (Human T Lymphotropic Virus type III) ou encore ARV (AIDS associated retrovirus) (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1983; Levy *et al.*, 1984). Récemment d'autres virus apparentés à VIH ont été isolés: le FIV (Feline Immunodeficiency Virus), le BIV (Bovine Immunodeficiency Virus) et la famille des SIV (Simian Immunodeficiency Virus).

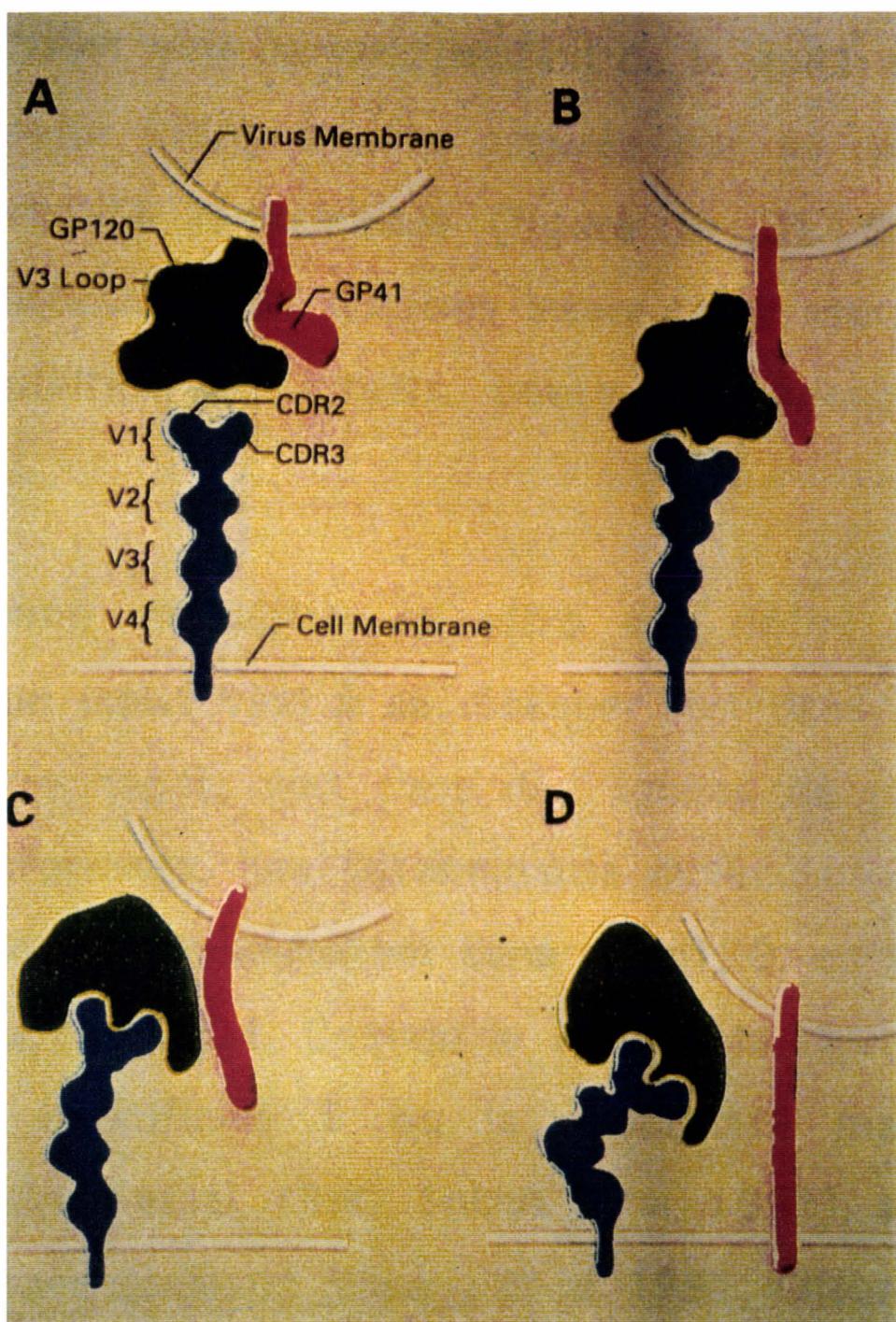
- *Les Spumavirus:* DéTECTÉS pour la première fois dans les cellules de singes qui dégénéraient en formant des syncitia, fusion entre plusieurs cellules, avec d'importantes vacuoles. Ils ne présentent pas de pathogénicité connue pour l'homme et sont présents chez de nombreux mammifères.

1.1 INFECTION ET REPLICATION

a) Adsorption et pénétration

Le VIH présente un tropisme préférentiel pour les cellules exprimant la molécule CD4, pour lequel la protéine d'enveloppe gp120 présente une forte affinité (Klatzmann *et al.*, 1984; Sattentau et Weiss, 1988; Dalgleish *et al.*, 1984).

La fixation de la gp120 sur son récepteur entraîne un changement de conformation du complexe gp120 et gp41, permettant la pénétration de la partie N-terminale de la gp41 déstabilisant la double couche lipidique cellulaire et déclenchant ainsi une fusion entre les membranes plasmiques et l'enveloppe du virus.



MECANISME DE PENETRATION DU VIRUS VIH

L'interaction CD4/gp120 constitue la voie d'infection préférentielle mais d'autres modes de pénétration, ne dépendant pas de CD4, existent. La particule virale recouverte d'anticorps ou de protéines du complément pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de la fixation de ces molécules sur leurs récepteurs respectifs. L'expression de la galactosylcéramide à la surface de certaines cellules, notamment les cellules épithéliales intestinales pourrait être aussi un récepteur potentiel alternatif de la gp120 (Fantini *et al.*, 1993) L'expression membranaire de la molécule CD4 est généralement réduite suite à la réPLICATION virale, bien que des exceptions aient été observées avec certaines souches.

b) Synthèse du provirus et intégration

Après pénétration de la particule virale (Varmus, 1988; Cullen et Greene, 1989) l'ARN viral est libéré et ensuite transcrit en ADN double brins à l'aide de la transcriptase inverse présente dans le virion. Cette réaction se passe dans le cytoplasme dans les 6 heures qui suivent l'infection. Elle est génératrice de mutations, car l'enzyme ne présente pas de système de correction des erreurs (erreur de $1/10^4$ nucléotides). L'ADN proviral, qui peut exister sous une forme linéaire ou circulaire, s'intègre dans l'ADN chromosomique de la cellule hôte. Cette intégration met en jeu l'intégrase, enzyme virale présente également dans le virion et nécessite l'activation lymphocytaire. Cependant, contrairement à la plupart des autres rétrovirus étudiés, l'infection par le VIH s'accompagne de l'accumulation d'une quantité importante d'ADN viral non intégré dans la cellule infectée (Stevenson *et al.*, 1990). Après l'intégration du provirus, l'activation de la cellule permet à l'ADN proviral d'être transcrit en ARN génomique viral et en ARN messager codant pour les protéines de structure. Lorsque l'assemblage du provirion est terminé, celui-ci bourgeonne à la surface de la cellule en emportant une partie de la membrane cytoplasmique.

Parmi les facteurs susceptibles d'activer l'expression du virus, on trouve le TNF α , l'IL-6, le GM-CSF ou l'IL-1 ainsi que les activateurs classiques de la celluleT à savoir les antigènes, les anticorps anti-CD3 ou anti-TCR.

Cette interaction étroite entre la régulation virale et cellulaire peut rendre compte d'une partie des effets pathogènes de l'infection par VIH.

1.2 STRUCTURE ET ORGANISATION GÉNOMIQUE

a) La structure virale

Le VIH présente un noyau dense (Rabson et Martin, 1985), formé des

protéines gag constituant une capsidé, contenant deux molécules identiques d'ARN simple brin, de polarité positive, de 10 kb, ressemblant à un ARN messager avec sa coiffe de méthylguanosine à l'extrémité 5' et sa séquence de polyadénylation en 3'. Chaque molécule d'ARN est couplée à un ARN de transfert spécifique servant d'amorce à la synthèse d'ADN. A ces deux molécules d'ARN sont associées les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase, endonucléase). La capsidé est elle-même entourée d'une enveloppe formée à partir de la membrane de la cellule infectée avec laquelle interagissent les protéines d'enveloppe gp120 et gp41.

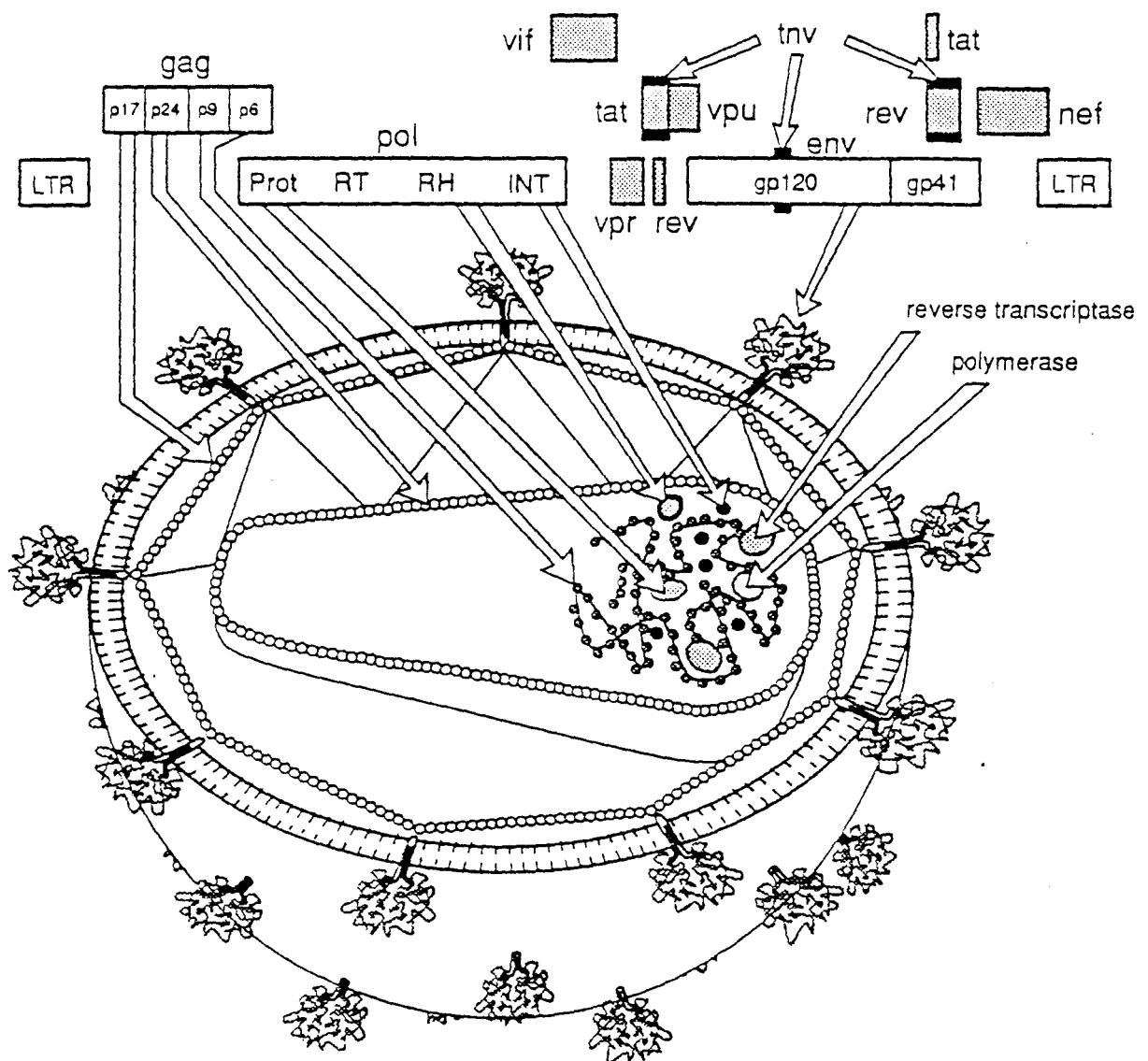
Comme tous les génomes rétroviraux, le génome est constitué d'une séquence contenant les trois gènes de structure: gag, pol, et env (Wain-Hobson *et al.*, 1985; Gerderblom *et al.*, 1987) dont les deux extrémités sont formées par les séquences LTR (Long Terminal Repeat), fournissant non seulement les extrémités permettant l'intégration, mais également des signaux de régulation transcriptionnelle. La transcription s'effectue à partir d'un promoteur unique, situé dans la région U3 du LTR et doit répondre à deux nécessités:

- l'une est la synthèse d'ARN de longueur complète (génomique) qui sera associé aux protéines internes du virion et incorporé dans les particules virales.
- l'autre est la synthèse d'ARN messagers spécifiques de chaque groupe de protéines virales (de structures et de régulations).

Ainsi, le VIH comporte:

- Le gène **gag** codant pour 3 protéines de la nucléocapsidé, associées à l'ARN viral.
 - p18: nucléoprotéine N-terminale
 - p24/25: protéine majeure
 - p15: nucléoprotéine C-terminale (ultérieurement clivée en deux protéines: p6 et p9)
- Le gène **pol** (polymérase) codant pour les enzymes impliquées dans le cycle de réPLICATION du virus:
 - la protéase virale p12 (aspartyl protéase)
 - la reverse transcriptase (RT, sous 2 formes: p51/68)
 - l'endonucléase-intégrase p34
- Le gène **env** codant pour la glycoprotéine d'enveloppe gp160 clivée en deux protéines gp120 et gp41.

A côté de ces protéines qui constituent le virion, le génome viral code pour 5 (VIH-1) ou 6 (VIH-2) molécules régulatrices différentes. Ces molécules



LE GENOME VIRAL

exprimées à l'intérieur de la cellule infectée agissent sur la latence de l'infection et sur la régulation de l'assemblage des virions.

- **tat** "trans- activator- gene"
- **rev** "regulator of virion expression "
- **vif** "virus infectivity factor"
- **nef** "negative enhancer factor"
- **vpr** "viral protein R"
- **vpu** "viral protein U", uniquement présent dans le virus VIH-1.

b) La région LTR

Cette région (Haseltine, 1991) contient plusieurs séquences reconnues par des protéines de régulation cellulaire. Certaines de ces protéines sont présentes dans toutes les cellules, tandis que d'autres ne sont présentes que dans certains types cellulaires différenciés. De même, certaines d'entre elles ne se lient au LTR qu'après activation cellulaire. Ainsi, on observe la participation de facteurs appelés:

TFIID: facteur reconnaissant la séquence TATA indispensable à l'initiation de la transcription.

Sp1: facteur de transcription reconnaissant trois sites adjacents entre les nucléotides -77 et -46 du LTR. La mutation de ces séquences entraîne une perte progressive de l'activité du LTR *in vitro*.

NF-kB: Il forme un complexe cytoplasmique de trois sous-unités: deux protéines de 48 à 55 kDa (p50) et de 65 à 68 kDa (p65) qui se lient à l'ADN; la troisième sous-unité appelée I kB interagit spécifiquement avec p65 et est responsable de la localisation du complexe NF-kB inactif dans le cytoplasme. La phosphorylation de la protéine I kB induit une dissociation de la protéine I kB du couple p50-p65 ainsi qu'une translocation nucléaire rapide de NF-kB.

NFAT-1: Ce facteur est synthétisé de *novo* lors de l'activation lymphocytaire T et reconnaît une séquence consensus au niveau des régions "enhancers" des promoteurs de l'IL-2 et du récepteur à l'IL-2.

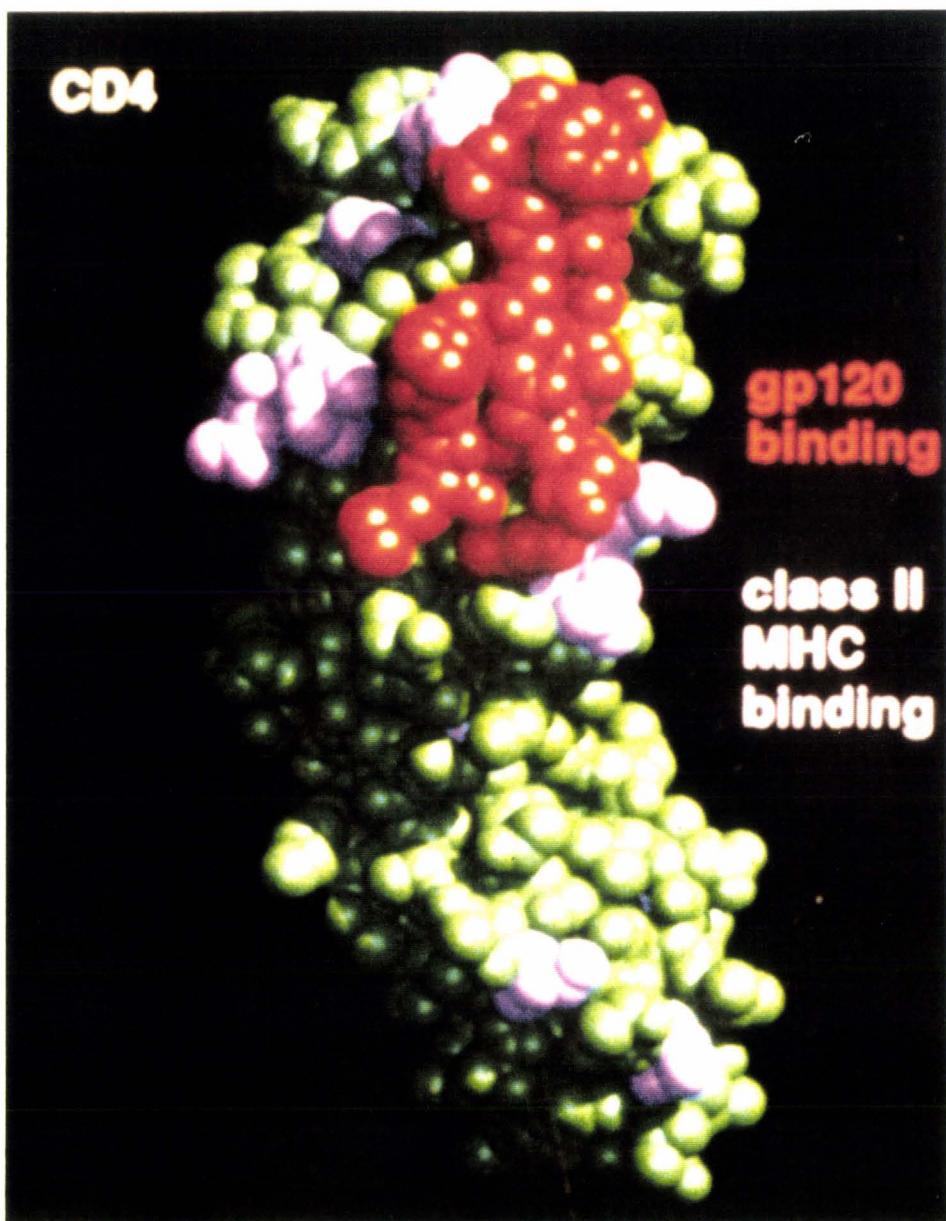
En outre, la délétion de la partie 5' du LTR du VIH, région appelée NRE "Negative response element" (-360; -140), conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle et réplicative du virus. Le groupe de Lu *et al.*, a mis en évidence en plus de la séquence NFAT-1, une région qui contribue à l'effet régulateur négatif.

c) La glycoprotéine d'enveloppe

La glycoprotéine externe de l'enveloppe du VIH permet la fixation du virus à son récepteur, la molécule CD4 (Mc Cune *et al.*, 1988; Mc Dougal *et al.*, 1986; Habeshaw *et al.*, 1990). En fait, seuls quelques épitopes de la molécule CD4 sont importants pour la fixation, tels que ceux reconnus par les anticorps Leu3a et OKT4a. La gp160 est tout d'abord synthétisée dans la cellule infectée sous la forme d'une molécule précurseur de 160 kDa, puis clivée dans le golgi par une protéase cellulaire aux stades tardifs de la réPLICATION virale en deux molécules, la gp120 et la gp41. Ce clivage apparaît nécessaire pour que les particules virales soient infectieuses. Les deux molécules sont associées à la surface du virus par des interactions non covalentes, encore mal définies. La fixation de la molécule gp120 sur la molécule CD4 induit un changement conformationnel du complexe gp120/gp41, libérant une partie hydrophobe de la molécule gp41 qui peut alors se fixer dans la membrane de la cellule permettant ainsi la fusion entre la membrane cellulaire et la membrane virale.

Une des caractéristiques principales du VIH-1 est son extraordinaire variabilité. Ainsi, la variabilité existant d'un patient à l'autre, retrouvée dans chaque isolat, amène au concept non plus de virus mais de population virale (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Schuitemaker *et al.*, 1992; Tersmette *et al.*, 1989). Elle existe aussi entre les différents isolats viraux chez un même patient. Une des principales raisons de cette variabilité est le taux élevé d'erreurs dans l'activité ADN-polymérase de la RT, favorisant en particulier des mutations G ->A. Les gènes gag et pol semblent relativement conservés alors qu'une grande variabilité existe dans le gène env. Cette variabilité génétique est sans doute responsable de l'apparition, au cours de la maladie, de variants viraux ayant des propriétés infectieuses différentes (Kuiken *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1992).

Les variations de séquence en acides aminés de la gp120 des différents isolats ont permis de définir 5 régions hypervariables, V1 à V5, sur le critère de moins de 25% d'homologies de séquence entre les différentes protéines (Putney et Mc Keating, 1990). Ces régions correspondent à des séquences antigéniques prédictes. Elles sont séparées par des régions constantes qui seraient impliquées dans la liaison à la molécule CD4 (Willey *et al.*, 1986). Le clivage protéolytique de V3 après l'étape de fixation de la gp120 sur le CD4 apparaît nécessaire pour l'entrée du virus.



INTERACTION MOLECULAIRE ENTRE LA MOLECULE CD4 ET LA GLYCOPROTEINE GP120

Le domaine V3, situé à la position 296-331, est particulièrement étudié. Il correspond à un site de liaisons de la gp120 à des anticorps capables de bloquer l'infectivité virale et d'empêcher ainsi les phénomènes de fusion entre les cellules infectées et non infectées. Ces anticorps, dits "neutralisants", sont détectés *in vivo* au moment de la séroconversion. Le taux d'anticorps anti-V3 diminue en général chez les patients développant un SIDA sans que l'on sache avec certitude si cet effondrement est simplement lié à une immunosuppression générale ou à des mutations dans V3 (Goudsmit et Nara, 1991).

d) La protéine tat

Il s'agit d'une protéine nucléaire trans-activatrice essentielle à la réPLICATION virale comprenant une région hautement conservée avec 7 cystéines et présentant une affinité pour les ions métalliques. Cette région formerait une structure du type "zinc finger" caractéristique des protéines de régulation transcriptionnelle (Frankel *et al.*, 1988). Elle interagit de façon spécifique avec les ARN du VIH au niveau d'une séquence nommée TAR ("*transactivation responsive*") située au niveau de la région R du LTR du VIH et présentant une structure secondaire en forme de boucle dont l'orientation et la localisation sont essentielles à la transcription. La trans-activation du LTR par tat nécessite également la liaison d'une protéine cellulaire de 68-kDa au site adjacent à l'extrémité du site TAR.

Son mode d'action reste encore discuté. Bien que tat joue un rôle essentiel dans la transcription, il semble que ce ne soit pas son seul rôle. En effet, tat pourrait également influencer la localisation cytoplasmique et donc la traduction des transcrits contenant la région TAR (Cullen, 1991; Haseltine 1991).

e) La protéine rev

Tandis que la protéine tat (Jeang *et al.*, 1991; Sodroski *et al.*, 1986) favorise la synthèse de tous les transcrits (2, 4 et 9 kb), la protéine rev assure une régulation plus sélective en permettant la traduction des longs transcrits de 4 et 9 kb. rev est donc un régulateur négatif de sa propre synthèse, mais également de celles de tat et de nef.

Deux domaines essentiels ont été identifiés:

- L'extrémité aminoterminal (40 premiers acides aminés) est une région riche en arginines, indispensable à la localisation nucléaire de rev et interagissant spécifiquement avec l'ARN au niveau du site RRE situé dans la région codant pour la gp120.

- Le second domaine (“activation domain”), riche en leucines, n’intervient ni dans la liaison au site RRE (Rev Responsive Element) ni dans la multimérisation de rev. Il est probable que cette séquence interagisse avec un des composants du transport des ARN ou du système d’épissage.

Bien que rev soit indispensable à l’accumulation dans le cytoplasme de longs transcrits, elle ne modifie pas le profil des ARN transcrits au niveau du noyau, un nombre important d’ARN non épissés est détecté dans le cytoplasme même en absence de rev.

f) La protéine nef

Le gène correspond à un cadre de lecture localisé à l’extrémité 3' du génome, en aval du gène env. La protéine nef (Hovanessian, 1992) est conservée chez l’ensemble des virus VIH-1, VIH-2 et SIV, suggérant son importance fonctionnelle et son rôle possible dans la pathologie. Il s’agit d’une protéine cytoplasmique de 27 kDa, myristylée à son extrémité N-terminale. Certaines propriétés biochimiques comparables à celles des protéines G ont été définies: capacité de fixation du guanosine 5'-triphosphate (GTP) associée à une activité GTPase, autophosphorylation et phosphorylation potentielle (thréonine en position 15) par la protéine kinase C, ainsi qu'une homologie des séquences de phosphorylation avec celles des proto-oncogènes src et ras. Toutefois, les activités GTP binding et GTPase de nef ont été remises en question.

La protéine a été initialement présumée exercer une inhibition de la transcription de l’ensemble des gènes viraux, participant ainsi à l’établissement et à la phase de latence du VIH au sein des cellules infectées d'où sa dénomination de "negative enhancer factor". Toutefois, le rôle apparent de régulateur négatif a été controversé par plusieurs travaux.

La délétion de la séquence codant pour nef ne modifie pas la capacité du virus SIV à se répliquer *in vitro*, mais modifie drastiquement le caractère pathogène de la souche (Kestler *et al.*, 1991). Nef interfère avec les signaux cellulaires induits suite à l’activation du récepteur T entraînant l’expression de IL-2 (Luria *et al.*, 1991). Une expression normale du récepteur pour IL-2 (IL-2R α), en réponse aux mêmes stimuli, est observée. Récemment, des souris transgéniques exprimant la protéine nef sous le contrôle du promoteur CD3 présentent une perturbation importante dans la maturation et l’activation des lymphocytes T CD4 $^{+}$ au niveau du thymus avec pour corollaire, une diminution des lymphocytes T CD4 $^{+}$ circulants. L’expression de nef est uniquement détectée

dans le thymus et non dans les organes périphériques.

g) La protéine vif

Le gène vif (Strebel *et al.*, 1987; Sodroski *et al.*, 1986) situé entre les gènes pol et env du génome du VIH, code pour une protéine de 24 kDa, conservée parmi les lentivirus VIH-2, SIV et FIV. L'expression des protéines vif et vpr est coordonné par rev. vif joue un rôle essentiel dans la maturation des protéines d'enveloppe. En l'absence de vif, l'incorporation de gp120 dans les particules virales est plus faible et les particules libérées sont peu infectieuses. Une diminution de l'infection de cellule à cellule est également observée.

h) La protéine vpu

vpu (Willey *et al.*, 1992) est une protéine phosphorylée de 16-kDa, non présente dans le virion et traduite à partir de l'ARNm bicistronique codant également pour la gp120. En l'absence de vpu, l'interaction gp160-CD4 se traduit par une dégradation de ce complexe et donc par une absence de maturation de la gp160, une expression de CD4 membranaire plus faible ainsi que par un nombre inférieur de particules virales libérées par la cellule. vpu diminue la formation de syncitia par les cellules T CD4+ infectées.

i) La protéine vpr

Cette protéine de 15kD est conservée chez les lentivirus (Cohen *et al.*, 1990). Il s'agit de la seule protéine de régulation présente dans les particules virales (100 copies/virus). vpr active également en trans un nombre élevé de promoteurs viraux (dont VIH) et cellulaires. L'ensemble de ces observations permet de penser que vpr joue un rôle durant la phase précédant la synthèse des protéines virales, peut-être en accélérant la transcription initiale et/ou en interagissant avec l'environnement cellulaire.

PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR VIH

2.1 IMMUNOPATHOLOGIE

a) *L'infection par VIH*

La base de l'immunopathogénie de l'infection par le VIH est la déplétion de la sous-population des cellules T CD4⁺ qui conduit à une immunodéficience profonde (Lane et Fauci, 1985; Weiss, 1993).

L'infection par le VIH peut être subdivisée en trois phases:

- Une phase aigüe qui dure quelques semaines, caractérisée par une réPLICATION virale intense et la mise en place de la réponse immunitaire.
- Une période de séropositivité s'étalant sur plusieurs années sans anomalie clinique. Aux premiers stades, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants est normal alors que le pourcentage de cellules infectées circulantes est faible, celui-ci augmente avec l'évolution de l'infection, de même que la virémie. Par contre, dès le début de l'infection, un nombre élevé de lymphocytes T CD4⁺ et de macrophages infectés est présent dans les organes lymphoïdes (Emberton *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993). Des particules virales sont également détectées à la surface des cellules folliculaires dendritiques. Les lymphocytes sains seraient infectés lors de leur migration dans les centres germinatifs des ganglions. Des particules virales sont également détectées dans le sang et leur nombre augmente avec l'évolution de l'infection.
- Une période de durée variable au cours de laquelle un effondrement du système immunitaire se manifeste avec pour corollaire, l'ensemble des pathologies bien connues (manifestations neurologiques, pneumonies à *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose, sarcome de Kaposi, lymphomes non hodgkinien, infections à mycobactéries atypiques...). Au cours de cette période, le nombre de lymphocytes CD4⁺ circulants chute tandis que le taux d'anticorps anti-p24 ainsi que la virémie augmentent.

b) *Les virus apparentés*

Nombre de caractères tels que tropisme cellulaire CD4⁺ et organisation génomique sont partagés par les lentivirus simiens (SIV) et humains (VIH). Toutefois le caractère pathogène ou non pathogène de l'infection varie en

fonction de la nature du virus simien et de l'espèce de singes infectés. Parmi ces modèles, l'analyse des séquences en acides aminés de la RT virale a permis une classification des virus et de leurs hôtes respectifs en 4 groupes présentant chacun, en son sein une homologie supérieure à 80%, et avec les autres une identité d'au moins 55%.

- Le mandrill (*Papio sphinx*) (Tsujimoto *et al.*, 1988) peut être naturellement infecté par un virus dénommé SIVmnd, sans qu'aucun signe clinique particulier n'ait jamais été détecté.

- Le chimpanzé (*Pan troglodytes*) est l'hôte du virus SIVcpz (Peeters *et al.*, 1990), sans signe de maladie. Le chimpanzé, l'espèce la plus proche de l'homme, est également le seul primate infectable par VIH-1 de manière chronique (Fultz *et al.*, 1986). L'infection expérimentale par le VIH-1 n'entraîne toutefois aucun signe pathologique, avec à ce jour un recul de plus de 10 ans. Ce modèle s'est avéré important pour les études de neutralisation du VIH et dans sa comparaison avec l'infection pathogène chez l'homme.

-Le singe vert d'Afrique (*Cercopithecus aethiops*) représente un groupe s'étendant du Kenya au Sénégal (Muller *et al.*, 1993; Gravell *et al.*, 1989). Or, 20 à 50% de ces singes sont séropositifs pour le virus SIVagm. L'infection par cette même souche chez des macaques (*Macaca nemestrina*) est tolérée, sans signe de SIDA.

- Chez le singe sooty mangabey (*Cercocebus atys*), l'infection est causée par le virus SIVsmm, non pathogène (Hirsch *et al.*, 1989).

- Quant au macaque (Daniel *et al.*, 1985), l'isolement d'une souche appelée souche SIVmac251 administrée à des macaques (*Macaca mulatta*) conduit à un SIDA semblable à celui rencontré chez l'homme, mais en un laps de temps plus court, en 1 à 3 ans, ce qui rend ce modèle très intéressant pour le suivi de l'évolution de la maladie et ses études expérimentales. Ce modèle présente un second intérêt qui est la disponibilité de clones moléculaires viraux pathogènes (SIVmac239) ou non pathogènes (SIVmac251). Il est à remarquer que les macaques ne sont pas infectés naturellement par SIVmac. L'isolat SIVmac251 a été obtenu à partir de singes captifs dérivé du virus SIVsmm de singes mangabeys détenus au sein des mêmes enclos. De manière intéressante, un isolat viral SIVsmmPBj14 induit un SIDA lors de son inoculation aux macaques (*Macaca nemestrina*, *Macaca fascicularis*) ainsi qu'au sooty mangabey. Il s'agit d'un virus porteur d'un super antigène conduisant à une très rapide et importante délétion du système immunitaire.

- Le VIH-2 provoque un SIDA chez l'homme comparable à VIH-1 mais en un temps beaucoup plus long.

2.2 LES EFFETS CYTOPATHOGENES

a) Rôle direct du virus

Dans les effets cytopathogènes directs du virus, plusieurs mécanismes ont été proposés (Fauci, 1988):

- L'accumulation d'ADN proviral non intégré.
- La perte de l'intégrité membranaire lors de la production d'une trop grande quantité de virions et de leur bourgeonnement à la surface de la cellule.
- Le développement du virus à l'intérieur de la cellule induit une différenciation terminale de la cellule entraînant sa mort précoce (Zagury *et al.*, 1986; Terai *et al.*, 1991).
- Enfin, le virus, par un mécanisme dépendant de l'expression de la molécule CD4, peut conduire à la formation *in vitro* de syncitia (Sodroski *et al.*, 1986). Elle s'effectue entre des cellules infectées et des cellules saines grâce à un pontage effectué par les molécules gp120 virales et les molécules CD4. Cependant, des syncitia T ne sont que très rarement détectés chez les patients suggérant que ce mécanisme n'est certainement pas prépondérant.

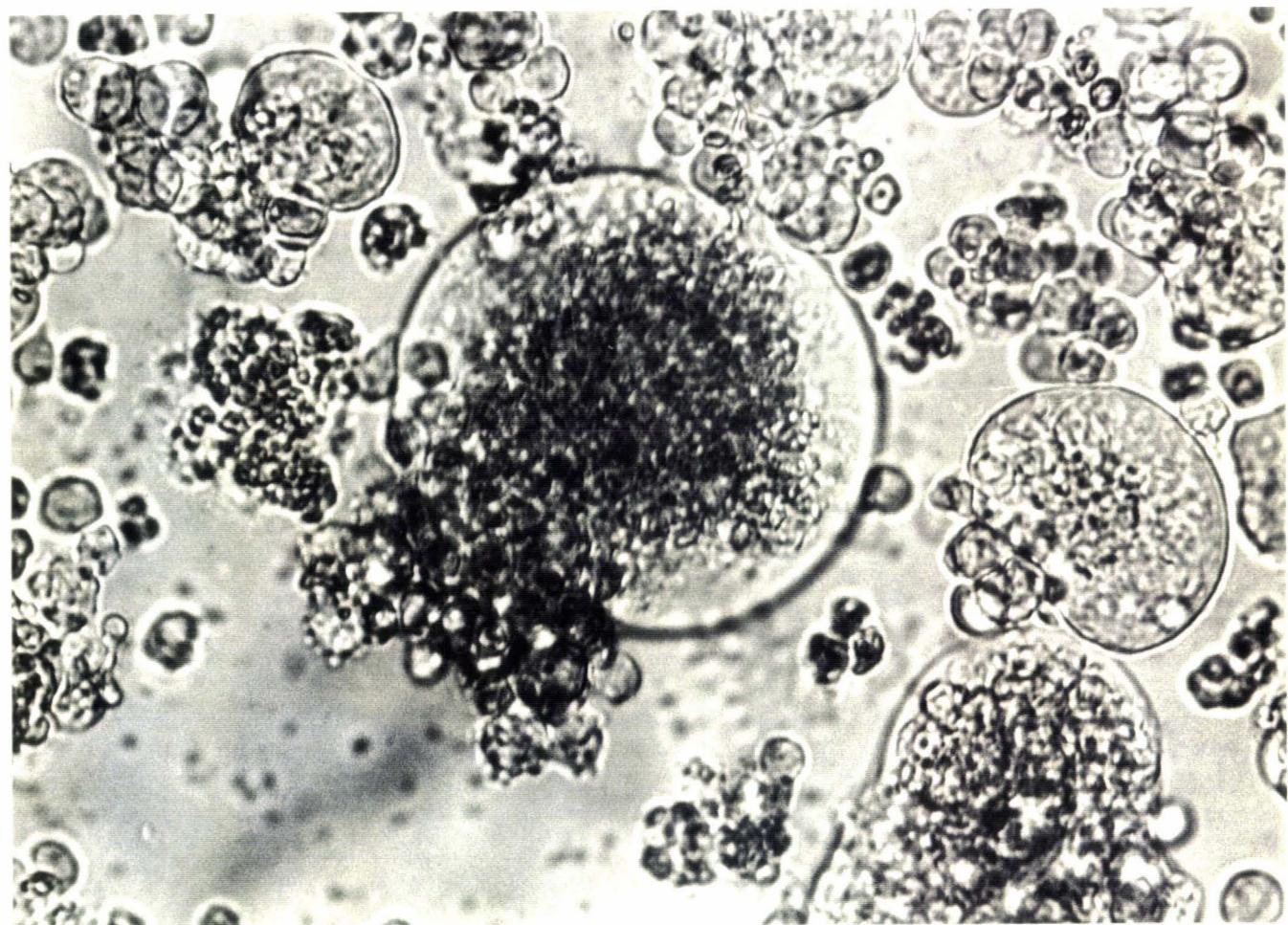
b) Mécanismes indirects

Seul un faible pourcentage des cellules CD4⁺ *in vivo* s'avère être infecté (1/10⁴ à 1/10³). Ainsi, les effets cytopathogènes directs ne peuvent rendre compte de la déplétion lymphocytaire CD4⁺ observée, d'où la proposition d'autres hypothèses telles que:

- L'infection des cellules immatures peut être une des causes de la disparition des cellules CD4⁺ en empêchant leur renouvellement (Folks *et al.*, 1988; Schnittman *et al.*, 1990):

- * Infection des cellules souches hématopoïétiques.
- * Infection des thymocytes immatures.

- La fixation de la molécule gp120 sur son récepteur CD4 à la surface des lymphocytes peut servir de cible pour la lyse de ces lymphocytes par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC) (Lyerly *et al.*, 1987).



SYNCITIA VIRAL

SYNCITIA VIRAL

2.3 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 décrite par de nombreux auteurs (Giorgi *et al.*, 1986; Danner *et al.*, 1988; Miedema *et al.*, 1988), et même si l'ampleur et les mécanismes inducteurs de celle-ci restent très discutés, sa subdivision en 3 étapes, en fonction des capacités prolifératives des patients, est uniformément admise.

- Au tout début de la maladie, dès 3 mois après séroconversion, les lymphocytes prolifèrent nettement moins bien en réponse aux antigènes mémoires et au mitogène pokeweed (PWM) alors que leurs réponses aux lectines comme la phytohemagglutinine (PHA), aux anticorps anti CD3 ou aux cellules allogéniques sont conservées.
- 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 cellules 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.

Pour expliquer ces dysfonctions lymphocytaires de nombreux modèles ont été proposés :

a) 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⁺. Ces cellules CD8⁺ présentent outre une fonction cytotoxique accrue une activité supressive (Wood *et al.*, 1986; Edelman et Zolla-Pazner, 1989). D'autres auteurs ont signalé la présence dans le sérum de patients infectés ainsi que dans le surnageant de culture de cellules activées de certains facteurs suppresseurs.. Ces données suggèrent un déséquilibre entre les cellules auxiliaires et suppressives qui pourrait conduire à une suppression active de la réponse immunitaire.

b) Réponses autoimmunes

De nombreuses manifestations auto-immunes sont observées chez les patients VIH⁺ (Kopelman et Zolla-Pazner, 1988), auto-anticorps (certains dirigés contre les lymphocytes T), complexes immuns dans le sérum, glomérulonéphrites, altérations histologiques caractéristiques du thymus et

purpura thrombocytopénique d'origine autoimmune. D'autres auteurs comparent le SIDA à une réaction du greffon contre l'hôte (Habeshaw *et al.*, 1992).

c) Signaux inhibiteurs fournis par les protéines virales

- La protéine gp120:

La molécule gp120 purifiée et le virus inactivé sont capables d'inhiber la réponse mitogénique aux antigènes ou aux anticorps anti CD3 (Mann *et al.*, 1987; Mittler et Hoffmann, 1989); l'agrégation par des anticorps anti- gp120 conduit à une meilleure efficacité. En outre, la formation du complexe gp120-CD4 modulerait la signalisation cellulaire via la molécule de transduction p56^{lck} (Crise *et al.*, 1992).

- La protéine tat:

La protéine tat essentielle à l'activation et à l'expression des gènes viraux est capable de pénétrer à l'intérieur d'une cellule, d'aller jusqu'au noyau et d'y activer certains gènes. Il s'avère que des expériences de prolifération lymphocytaire ont montré une inhibition de la réponse à des antigènes mais non à des mitogènes (Frankel et Pabo, 1988; Viscidi *et al.*, 1989).

d) Infection et destruction sélective des cellules mémoires:

Les cellules CD29⁺ (cellules dites T mémoire) de patients VIH présentent une infection sélective, une diminution de leur nombre et des analogies fonctionnelles à des cellules (CD29⁻) dites naïves (Miedena *et al.*, 1990).

e) Cytotropisme

La capacité à infecter et à se répliquer dans des populations stimulées telles que les lymphocytes du sang périphérique ou des macrophages dérivés de culture de monocytes sanguins (MDM) a été définie (Schwartz *et al.*, 1989; Werstervelt *et al.*, 1992). Cette propension semble être gouvernée à la fois par la boucle V3 de la gp120 (Shioda *et al.*, 1992) et par des déterminants situés en dehors de cette boucle (O'Brien *et al.*, 1990).

Des isolats dérivés du cerveau, du tissu pulmonaire et à moindre degré de l'intestin partagent un tropisme macrophagique plus ou moins marqué. Seules des souches monocytotropes semblent capable d'infecter les cellules microgliales en culture (Watkins *et al.*, 1990; Jordan *et al.*, 1991).

Le virus est également détecté dans les espaces intercellulaires des cellules folliculaires dendritiques, combiné à des complexes immuns, et non dans les

cellules elles-mêmes, bien que celles-ci soient probablement d'origine monocytaire et soient infectables *in vitro* (Langhoff *et al.*, 1991).

Plus récemment, deux nouvelles hypothèses ont été émises pour tenter de donner une explication rationnelle au dysfonctionnement et à la déplétion cellulaire CD4⁺ qui sont l'apoptose ou mort cellulaire programmée et expansion de cellules TH2 au détriment des cellules TH1 au cours de l'infection.

f) Apoptose ou mort cellulaire programmée:

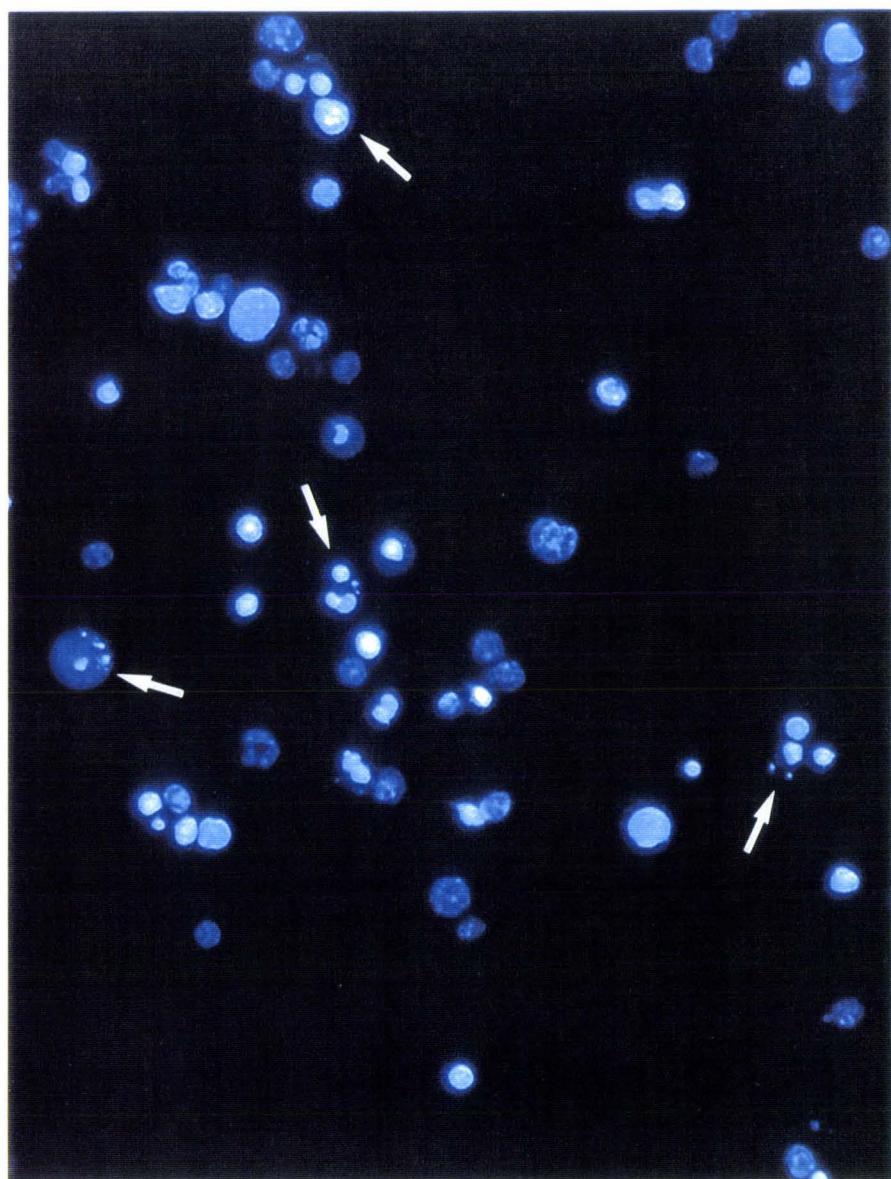
Cette hypothèse formulée par J.C. Ameisen et A. Capron en 1991 réside dans l'induction d'une forme inappropriée de mort cellulaire programmée dans les lymphocytes CD4⁺ matures. Du grec "*ptosis*", (chute) par analogie à la chute automnale des feuilles d'un arbre, l'apoptose est caractérisée morphologiquement par une condensation nucléaire suivi le plus souvent d'une fragmentation de l'ADN en multiples de 200 paires de bases correspondant à la taille d'un nucléosome (Cohen, 1993). Phénomène actif, elle nécessite une cascade d'événements cellulaires d'induction, de transduction et de traduction du signal (Mc Conkey *et al.*, 1990). La cellule qui meurt participe activement à sa propre mort d'où le terme de "suicide cellulaire".

Cette hypothèse de mort cellulaire survenant au cours de l'infection par VIH a depuis cette date été expérimentalement testée par de nombreuses équipes et a donné aval à cette hypothèse.

Ainsi, les cellules de patients infectés par VIH présentent une perte de la viabilité cellulaire *ex vivo* spontanément ou après activation cellulaire par des antigènes polyspécifiques (Groux *et al.*, 1992; Gougeon *et al.*, 1993, Meyard *et al.*, 1992) tels que:

- Pokeweed mitogen (PWM)
- Le superantigène de l'entérotoxine B staphylococcique (SEB)
- Les anticorps dirigés vis à vis du complexe TCR/CD3

Outre la mort des cellules CD4⁺, les cellules CD8⁺ présentent également une mort cellulaire plus importante que celle rencontrée chez des individus sains. Ces phénomènes de mort cellulaire apparaissent être en relation étroite avec la pathogénicité virale récemment explorée dans les modèles de singes pour lesquels il est possible d'induire ou non un SIDA (Estaquier *et al.*, 1994; Del Liano *et al.*, 1993). Quant aux mécanismes responsables de cette programmation inappropriée des cellules T, ils restent encore à définir.



CELLULES APOPTOTIQUES

L'enveloppe du VIH suite aux résultats de Terai *et al.*, (1991) et Benda *et al.*, (1992) ainsi que ceux de Laurent-Crawford *et al.*, (1993) a été montrée comme susceptible de participer à l'induction de la mort cellulaire. En outre, au niveau thymique, le virus est susceptible d'induire des phénomènes de mort cellulaire (Bonyhadi *et al.*, 1993; Mosier *et al.*, 1993).

Toutefois, il est vraisemblable que la programmation des lymphocytes *in vivo* ne résulte pas uniquement de l'infection virale mais implique des interactions avec le système immunitaire (Golstein *et al.*, 1991) d'où l'hypothèse de Shearer G. et Clerici M. (1993).

g) TH1 et TH2

Les cellules CD4⁺ représentent une population fonctionnellement hétérogène dans leur profil de sécrétion des cytokines. Les cellules TH1 sécrètent l'interleukine 2, l'interféron-γ participent aux réponses à médiation cellulaire et à l'activation du macrophage; les cellules TH2 sécrètent l'interleukine 4, l'interleukine 5, et l'interleukine 10, et sont associées aux réponses humorales et allergiques. En l'absence d'une différenciation marquée, soit en TH1, soit en TH2, elles sont appelées TH0. Or, en examinant les lymphocytes circulant de patients séropositifs VIH⁺, G. Shearer et M. Clerici ont émis l'hypothèse et initiallement observé qu'à la progression de la maladie était associée une production accrue d'interleukine 4 et d'interleukine 10. Ainsi, ils ont suggéré qu'un déplacement du profil TH1 vers un profil TH2 jouait une rôle majeur dans la progression de l'infection.

Or de nouvelles études (Emilie *et al.*, 1994; Pantaleo *et al.*, 1994; Romagnani *et al.*, 1994), ainsi que la nôtre au laboratoire, ont évalué l'expression de ces cytokines:

- soit par l'analyse des cytokines sécrétées après restimulation et clonage cellulaire.

- soit par l'expression des ARNm exprimés dans les ganglions lymphatiques de patients infectés par VIH.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'existe pas de déplacement global vers un profil TH2. Romagnani *et al.* montre toutefois que le VIH-1 se réplique de préférence dans les clones TH2 et TH0 plutôt que dans les clones TH1. Nos travaux en outre suggèrent une régulation de la mort cellulaire programmée ou apoptose par les cytokines, ouvrant de nouvelles stratégies thérapeutiques.

ARTICLE 1

T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (VIH-1) nef protein in rats and chimpanzees.

Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J.C., Gras-Masse H., Lecocq J.P., Barbier B., Dixson A., Tartar A., Capron A., and C. Auriault.

Molecular Immunology, 1992, 29: 489-499.

A la suite des travaux de Ranki *et al.* (1987) et d'Ameisen *et al.* (1989) suggérant l'existence au cours de l'infection par VIH d'une réponse humorale anti-nef précoce, ainsi que l'induction de cellules CD8 dites cytotoxiques montrées par Culman *et al.* (1989) et Chenciner *et al.* (1989), l'objectif de nos travaux a été d'étudier l'immunogénicité de la protéine nef recombinante, c'est à dire sa capacité à induire une réponse immune après injection. Nous avons recherché en outre à définir à l'aide de peptides synthétiques, réalisés par C. Boutillon dans le laboratoire du professeur A. Tartar, les structures antigéniques de la protéine nef reconnues par les cellules T.

Le test utilisé pour visualiser cette réactivité cellulaire, si imparfait qu'il puisse paraître désormais, est le test de prolifération lymphocytaire basé sur la capacité à incorporer lors de la division cellulaire une base radiomarquée, la thymidine. Quant aux protocoles d'immunisation, deux types d'adjuvants ont été utilisés: l'adjuvant de Freund, pour les modèles rongeurs (rats Lou M) et l'hydroxy d'alumine, utilisé classiquement en vaccination humaine, et ici utilisé pour immuniser 4 chimpanzés (Mgbadolite, Cheetha, Bakoumba et Julie).

Nos résultats montrent que:

1) La protéine nef s'avère être immunogène, chez le rat Lou M et les chimpanzés immunisés par la protéine recombinante. En effet, une prolifération spécifique des lymphocytes T CD4⁺ issus de ces animaux immunisés était obtenue après restimulation *in vitro* par la protéine nef.

2) Parmi les cinq peptides utilisés (2-23, 45-69, 79-94, 98-112 et le peptide 148-161), seul le peptide 45-69 est capable de restimuler les lymphocytes T, de rat Lou M immunisés par la protéine nef. De plus, outre ce peptide 45-69 capable de restimuler les lymphocytes T des deux chimpanzés immunisés par la protéine d'autres peptides tels que le peptide 98-112 sont susceptibles de restimuler ces mêmes cellules.

3) Le peptide 45-69, utilisé pour immuniser des rats Lou M s'avère être immunogène. Les cellules T sont restimulables *in vitro* à la fois par le peptide et la protéine nef démontrant l'existence d'un épitope T dans cette région de la protéine.

4) L'utilisation de peptides dérivés de la région 45-69 à savoir les peptides 45-59, 50-64, 55-69 et 50-59 a permis d'identifier la séquence directement impliquée dans la reconnaissance cellulaire T. Il s'agit de la région 50-59. Toutefois, l'adjonction d'un groupement acétylé en partie N-terminale confère au

peptide une bien meilleure capacité à être présenté aux cellules T.

5) Enfin, par l'étude du dichroïsme circulaire des peptides 45-69 et 50-64 a permis de révéler leurs conformations. Ainsi, si le peptide 45-69 adopte une conformation hélicoïdale, structure prédictive au sein de la protéine nef, le peptide 50-64 quant à lui adopte une structure en feuillet β plissé.

T HELPER CELL EPITOPE OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV-1) NEF PROTEIN IN RATS AND CHIMPANZEES*

JEROME ESTAQUIER,^{†‡} CHRISTOPHE BOUTILLON,[§] JEAN-CLAUDE AMEISEN,[†]
HELENE GRAS-MASSE,[§] JEAN-PIERRE LECOCQ,^{||} BERNARD BARBIER,[¶]
ALAN DIXSON,^{**} ANDRE TARTAR,[§] ANDRE CAPRON[†] and CLAUDE AURIAULT[†]

[†]Centre d'Immunologie des maladies transmissibles et allergiques, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur Lille Cedex, France; [§]Chimie des biomolécules, URA-CNRS 1309, Institut Pasteur Lille Cedex, France; ^{||}Transgene SA, Strasbourg, France; [¶]Centre de biophysique moléculaire, CNRS, 45045 Orléans Cedex, France; and ^{**}Centre de Primatologie, Centre International de Recherches Médicales (CIRM) de Franceville, Gabon

(First received 9 April 1991; accepted in revised form 26 August 1991)

Abstract—T helper cell antigenic and immunogenic determinants of the nef protein were investigated in the rat and chimpanzee models using recombinant nef protein and five synthetic peptides selected according to their amphipathic and α -helicity properties. The nef protein was shown to be immunogenic with both Freund's or aluminium hydroxide adjuvants. After immunization with the nef protein the 45–69 peptide was the most antigenic in rat and monkey models. In contrast, the 98–112 peptide, that required a carrier protein to induce *in vitro* rat T cell recall proliferation, was able to restimulate monkey T cells in the absence of a carrier. The amino acid sequence carrying the antigenic activity of the 45–69 peptide was further investigated by synthesizing short peptides overlapping this region. The antigenic sequence was precisely located in the middle of the peptide (region 50–59). This sequence was antigenic only when *N*^α-acetylated. Circular dichroism analysis of the 45–69 peptide and the *in vitro* activity of the *N*-terminus group indicate in this case the involvement of the α -helical propensity for antigen presentation. However, the shorter sequence 50–64, able to induce a T cell reactivity, was determined as a β -pleated sheet structure in aqueous solution.

The 45–69 peptide was not only antigenic but also immunogenic and behaved *in vivo* as a functional T helper cell epitope. Indeed, the priming with the peptide or the transfer of peptide specific T cells to a naive recipient, followed by immunization with the nef protein, enhanced the subsequent antibody response to the nef protein.

Together, these data indicate that the 45–69 peptide appears as a candidate for the *in vivo* elicitation of T cell immunity to the HIV-1 nef regulatory protein.

INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus (HIV) is the etiological agent of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (Barré-Sinoussi *et al.*, 1984; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984). HIV not only codes for the three structural proteins gag, pol, env that constitute the virion but also for six additional accessory or regulatory proteins that are absent from virion but expressed in the infected cells (Fauci, 1988). These cells first express three regulatory gene products, nef, tat and rev, and only after a threshold of rev has been obtained are virion proteins

synthesized (Cullen and Greene, 1989). Among the three early expressed regulatory gene transcripts, nef has been reported to be predominant (Robert-Guroff *et al.*, 1990). Nef (negative enhancer factor) encodes a 27 kD GTP-binding phosphoprotein (Allan *et al.*, 1985; Arya and Gallo, 1986; Franchini *et al.*, 1986; Guy *et al.*, 1987) that has been reported to down-regulate CD4 cell surface expression (Guy *et al.*, 1987); a possible role of nef as a transcriptional silencer of HIV (Luciw *et al.*, 1987; Ahmad and Venkatesan, 1988; Niederman *et al.*, 1989), responsible for the establishment and maintenance of latent infection (Cheng-Mayer *et al.*, 1989) has been proposed, but has led to diverging reports (Kim *et al.*, 1989; Hammes *et al.*, 1989). The nef protein is expressed in HIV infected T cell lines and has been found on the surface of mononuclear cells from HIV infected individuals (Durda *et al.*, 1988; McSharry *et al.*, 1990). Nef is immunogenic in some, but not all, HIV infected individuals. During the clinically silent phase that precedes AIDS, antibodies directed towards nef have been detected in around half the infected individuals, early after infection (Ranki *et al.*, 1987; Khalife *et al.*, 1988;

*This work was supported by ANRS, EEC (STD2 Program), the Republic of Gabon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

†Author to whom correspondence should be addressed at: Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur Lille Cedex, France.

Abbreviations: CD, circular dichroism; Nac, *N*^α-acetylated; SI, stimulation index; TCGF, T cell growth factor.

Ameisen *et al.*, 1989) and nef-specific cytolytic T cells have been identified (Culmann *et al.*, 1989; Koening *et al.*, 1990).

A vaccine strategy based on the use of this protein could allow the targeting of immune effector mechanisms towards infected cells prior to their initiation of significant virion synthesis, and therefore prevent viral release and spread of HIV infection related to the destruction of infected cells.

Vaccines should include all the components needed to elicit a protective immune response, and in particular appropriate T cell epitopes. Indeed, T cell dependent immunity appears as a major defense mechanism against viral infections, and helper T cell activity is essential for the induction and regulation of the memory antibody response as well as for the cytotoxic T lymphocyte activity. The response of T helper cells, in contrast to that of B cells, is restricted to a limited number of antigenic sites, in close association with MHC class II molecules, and usually requires Ag processing (Heber-Katz *et al.*, 1983; Schwartz, 1985; Ashwell and Schwartz, 1986). T cell epitopes often present particular physicochemical characteristics including the property to fold as amphipathic α -helical structures (DeLisi and Berzofsky, 1985; Margalit *et al.*, 1987; Spouge *et al.*, 1987).

Our approach has been to predict the T helper cell epitopes of the nef protein from the LAV_{BRU} HIV strain sequence (Wain-Hobson *et al.*, 1985), to synthesize the peptides corresponding to such regions, and to test them in rats and chimpanzees (*Pan troglodytes*). We defined T cell epitopes as previously referred by Berzofsky (1985) as an antigenic, immunogenic peptide cross-reacting with the whole protein. Moreover, one of the peptides induced functional helper T cells *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Media and reagents

For all cultures, RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France), containing 20 mM HEPES (*N*-2 hydroxyethylpiperazine-*N*-2 ethane sulfonic acid) (Sigma, St Louis, MO), 100 U penicillin/ml, and 100 μ g streptomycin/ml (Specia, Paris, France) containing 10% heat inactivated FCS (Gibco) was usually supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Germany) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco).

Antisera

Monoclonal antibodies (mAb) were obtained from Sera-Lab Ltd (Crawley Down, U.K.): W3/25, a mouse IgG1 mAb directed against rat T helper cells; OX 8, a mouse IgG mAb antibody against rat T cells (non-helper cells); W3/13, a mouse IgG mAb against T lymphocytes. Depletion experiments were performed using a goat polyclonal antimouse antibody (Miles, Puteaux, France).

Recombinant nef Ag

A cDNA encoding for the nef protein of HIV-1 was expressed in *Escherichia coli* using a PL-expression vec-

tor. The recombinant purified (95% purity) nef protein was prepared by Transgene S.A. (Strasbourg, France).

Peptide selection and synthesis

Prediction of α -amphipathic structures, expected to correlate with determinants recognized by T cells (DeLisi and Berzofsky, 1985), was achieved by determining both helical propensity (Chou and Fasman, 1974) and hydrophobic moment (Eisenberg *et al.*, 1982), and calculated along the sequence for seven residue-blocks, considering an α -helix periodicity (i.e. 3.6 residues per turn, 100° per residue). All selected peptides contained sequences with significant helical propensity, associated with a high helical hydrophobic moment, except the 45–69 peptide; this peptide was considered because of its very high helical propensity and also because it contains an unusual acidic poly-glutamic acid pattern. Under physiological conditions, this pattern is charged, and thus included in the accessible surface area in neutral medium. However, during antigen processing in the acidic intralysosomal medium this poly-glutamic pattern will be mostly uncharged, and thus less exposed to enzymatic degradation. The corresponding synthetic peptides were indeed almost insoluble in acidic medium, and soluble at neutral pH. The presence of the Rothbard pattern (Rothbard and Taylor, 1988) was also examined and different consensus sequences were present (Table 1).

Peptides were synthesized using the solid-phase method (Merrifield, 1963), according to the BOC-benzyl strategy, tBOC-*N*^a protected amino acids (peptide Institute, Osaka) were sequentially coupled to a *p*-methylbenzhydrylamin-resin (MBHA, Applied Biosystems) for 45–69 peptide and its subfragment (45–59, 50–64, 55–69 and 50–59) or chloromethyl resin for all other peptides. Side chain protecting groups were: Arg (tosyl), Asp (benzyl ester), Cys (4-methylbenzyl), Glu (benzyl ester or cyclohexyl ester), His (dinitrophenyl), Lys (2-chlorobenzylloxycarbonyl), Ser (*O*-benzyl), Thr (*O*-benzyl), Trp (*N*-Formyl) and Tyr (dichlorobenzyl or 2-bromobenzylloxycarbonyl).

Acetylated peptides were obtained by reactions with acetic anhydride after deprotection and neutralization of the *N*-terminal function. At the end of the synthesis, the resin was dried, cleaved and deprotected in a Teflon-Kel F-HF apparatus (Asti, Courbevoie, France), in a low concn of HF in dimethylsulphide and, in the presence of *p*-cresol and thiocresol, for 2 hr at 0°C followed by a high HF procedure for 1 hr at 0°C (Tam and Merrifield, 1987). The cleaved deprotected peptides were lyophilized and purified under acidic conditions in order to avoid disulphide formation. Peptide 45–69 was gel filtrated on TSK HW 40S trisacryl in 50% acetic acid, and then purified by reversed-phase HPLC in a acetonitrile-water-trifluoroacetic acid solvent system. Other peptides were purified by preparative reversed-phase HPLC. Peptides were checked for homogeneity by TLC and reversed-phase HPLC, and for identity, by amino acid after total acid hydrolysis. Peptide 45–69 and its subfragment were obtained with a carbamide *C*-terminal

Table 1. Amino acid sequences and criteria used for the selection of the synthetic peptides of the nef. Occurrence of a probable helix nucleation was predicted using the method of Chou and Fasman (1974). The last column indicates the number of Rothbard patterns present in each peptide and underlined in the sequences

| | 2-23 | 45-69 | 79-94 | 98-112 | 148-161 |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------|-------|--------|---------|
| 2-23 | NH ₂ -GGKWSKSSVVGWPTVRERMRR-A-COOH | | | | |
| 45-69 | CH ₃ -CO-NH-SSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFP-CO-NH ₂ | | | | |
| 79-94 | NH ₂ -MTYKA V DLS <u>H</u> FLEK-COOH | | | | |
| 98-112 | NH ₂ -EGLIHSQRRQ <u>D</u> ILD-L-COOH | | | | |
| 148-161 | NH ₂ -VEPDKVEEANKGEN-COOH | | | | |
| | 2-23 | 45-69 | 79-94 | 98-112 | 148-161 |
| Helical nucleation | - | + | + | - | + |
| Alpha amphiphilicity | - | - | + | - | + |
| Pattern of Rothbard | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 |

function and the 2-23, 79-94, 98-112 and 148-161 peptides were obtained with a carboxylic C-terminal function.

Conjugation of synthetic peptides with a carrier protein

Peptides were coupled to BSA (Sigma) using glutaraldehyde (Merck) as homobifunctional crosslinking agent or 6-maleimidocaproic-*N*-hydroxysuccinimide (MCS) (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) as heterobifunctional cross-linking agent.

For glutaraldehyde conjugation, BSA was dissolved (3 mg/ml) in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2. Three equivalents of the peptide (2-23, 98-112 or 148-161) were added with regard to the estimation of available NH₂ groups in BSA (250 nmol/mg) and pH was then adjusted to 8 with sodium hydrogenocarbonate. Nine equivalents of glutaraldehyde (2.5% in water) were added with respect to available NH₂ groups in BSA, during 3 days, with continuous stirring, in the dark, at room temp. After 4 days, the resulting mixture was dialysed exhaustively against phosphate buffered saline (PBS).

For MCS conjugation, BSA was dissolved (3 mg/ml) in 25% dimethylformamide (DMF) in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2. Separately, three equivalents of MCS, in regard to the estimation of available NH₂ groups in BSA (250 nmol/mg) were mixed with nine equivalents of benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphate (BOP) (Richelieu Biotechnologies, St. Hyacinthe, CQ Canada) and a 27-fold excess of *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) in DMF for 10 min, at 0°C, with stirring. Then the mixture was added to BSA. After a reaction period of 24 hr, at room temp, the reaction was dialysed against 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2. The amount of maleimido groups coupled per mg of BSA was determined using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sedlak and Lindsay, 1968). Three equivalents of peptide (45-69 and 79-94 of HIV-1 LAV_{BRU} nef which contain 1 mol of Cys per mol of peptide) in relation to the amount of maleimido groups were added to the activated BSA. The reaction mixture was stirred for 24 hr, at room temp. The reaction product was then dialysed exhaustively against PBS.

The peptide content of each conjugate was determined by amino acid analysis compared to the amino acid composition of BSA alone (Antoni and Presentini, 1989).

These conjugates were sterilized by filtration through 0.22 µm filters (Sartorius, Göttingen, Germany).

Animals

Male inbred LOU M rats expressing the RT-1^u haplotype were used throughout the experiments. The animals were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur or purchased from C.S.E.A.L. (CNRS, Orléans, France). The chimpanzees used in these studies consisted of four healthy animals living in the Centre International de Recherches Médicales in Gabon; two females, Cheetah (C) and Julie (J), that were both 9 years old, and two males, Bakoumba (B) and Mgbadolite (M), that were 8 and 6 years old, respectively.

Immunization procedures

Lou M rats were immunized at the base of the tail with either the recombinant nef (40 µg) molecule LAV_{BRU} or the peptide (100 µg) in complete Freund's adjuvant (CFA) (Difco, Detroit, MI). Fifteen days later, rats were boosted according to the same protocol with Ag emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). One chimpanzee of each sex were assigned to either the nef protein or the placebo group (*E. coli* of the same strain), using the aluminium hydroxide as adjuvant. The chimpanzees that received the recombinant nef protein were C and M while J and B animals received the placebo. All four chimpanzees received a total of five injections over a period of 4 months. For each immunization, 0.5 ml of either nef (100 µg/ml) or the placebo control was injected intramuscularly in the thigh, and 0.5 ml was injected s.c. in the arm.

T cell proliferation assay

Five days after the second injection the rat lymph nodes were removed and T cells were purified by passage through a nylon wool column (Julius *et al.*, 1973). A total of 5 × 10⁵ T cells were cultured with 10⁶ syngeneic irradiated (30 Grey, Philips RT, filter 1.7 A1, 100 Ku, 8 mA) thymic APC and antigen in a total volume of

0.2 ml in flat-bottomed 96 wells plates (Falcon, Becton Dickinson, France) in a humidified CO₂ incubator at 37°C. Peripheral blood lymphocytes (PBL) from chimpanzees were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. PBL (10⁵ cells) were cultured as described above without β-mercaptoethanol. A mixture of PBL and 2-aminoethylisothiouronium bromide hydrobromide-treated sheep erythrocytes (E_{AET}) was layered onto Ficoll-Paque and centrifuged at 600 g for 2.5 min as described by Mikamo (1988). The pellet was then treated with an NH₄Cl solution while B cells and macrophages were treated by mitomycin c.

Five days later, a pulse with 18.5 kBq of [³H]-TdR to each well (CEA, Gif-sur-Yvette, France) was made in order to measure T cell proliferation; 12–16 hr later the wells were harvested onto glass fibre filter strips using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway) and the radioactivity incorporated into DNA was determined by liquid scintillation counting (LKB, Wallac, Turku, Finland). The stimulation index (SI) was calculated by dividing the mean counts per min of ³H-TdR incorporated into cells containing antigen by the mean counts per min (cpm) of ³H-TdR incorporated into cells without antigen. Probability based on a Student's test for replicates in the presence of peptide compared to control without antigen. Values of <0.05 were taken as significant and values listed as <0.1 indicate borderline significance.

Separation of CD4 and CD8 T cells

Purified T cells were treated with monoclonal mouse anti-W3/25 or anti-OX8 (4°C for 45 min). A solution of goat anti-mouse in PBS was used to coat Petri plates (4°C overnight). Coated plates were then washed 3 times with PBS and incubated with RPMI 1640 (25°C/15 min with 5% FCS). T cells treated (10⁶ cells/ml) in RPMI containing 5% FCS were added to these plates and incubated at 4°C for 90 min. After this incubation, the non-adherent T cells were removed gently and washed twice. The purity was around 90–95% in all cases.

Evaluation of peptide induced T cell helper activity

T cell helper activity was determined by either transfer to 45–69 peptide-specific T cell or priming rats with the corresponding peptide, in order to appreciate their ability to produce *in vivo* after challenge with nef protein.

One day before immunization with the recombinant nef Ag, 15 × 10⁶ peptide specific T lymphocytes were injected i.v. into each rat. Control rats were injected i.v. with 15 × 10⁶ cytochrome c specific T lymphocytes.

Rats were primed with 100 μg of peptide in CFA and boosted with the same amount in IFA 2 weeks later. Twenty-five days after priming the rats were challenged with 10 μg of nef in IFA, and sera were collected for antibody analysis.

Solid-phase immunoassay procedure

Microtiter plate wells (Nunc) were coated during 24 hr at room temp with 0.1 ml/0.5 μg of nef or synthetic peptides in 0.015 M Na₂CO₃/0.035 M NaHCO₃ buffer,

pH 9.6. A 2-hr saturation at room temp was then carried out by addition of 0.1 ml PBS (0.1 M) containing 3% BSA. The plates were washed twice in PBS Tween 1% prior to the addition of 0.1 ml of appropriate dilutions of sera to be tested. The plates were then incubated at room temp for 24 hr, then after two washings, rat IgG were revealed by a rabbit anti-rat peroxidase with OPD reagent. The result was expressed as OD.

Circular dichroism measurements

Spectra were taken using a Roussel Jouan model II at room temp CD studies were performed on peptides (hydrochlorides), dissolved in NaCl 200 mM in cells of 0.01 cm path length. Peptide concns were determined by quantitative amino acid analysis after total acid hydrolysis, and were 10⁻² M. CD results were reported in terms of mean residue ellipticity (θ) expressed in deg.dmol⁻¹ cm². Helix content was calculated from the CD spectra taking (θ) 222 nm = -35,700 deg.dmol⁻¹ cm² for 100% helicity.

RESULTS

Proliferative response of CD4 and CD8 enriched T cell populations from rats immunized with nef

CD4 (W3/25) and CD8 (OX8) purified T cells, were separated from rat lymph nodes by a panning procedure, in order to analyse their respective proliferation in response to the nef protein. The CD4 purified T lymphocytes exhibited a significant proliferative response while CD8 T cells did not (Fig. 1). Moreover, when the two CD4 and CD8 subpopulations were mixed in respect to their initial proportion determined by flow cytometric analysis (3/2), no difference in ³H-TdR incorporation was observed when compared with the sole CD4 subpopulation. Thus, CD8 T cells, even in the presence of CD4 T cells, did not proliferate under these

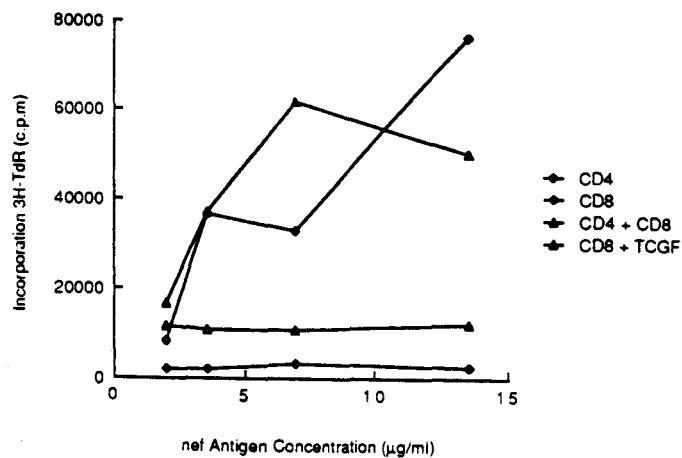


Fig. 1. *In vitro* response to the nef protein of CD4 (3 × 10⁵ cells) and CD8 (2 × 10⁵ cells) purified T cells (90–95% pure) from rats immunized with nef. An experimental panning procedure was used as described in Materials and Methods to separate the T cell populations. The different backgrounds were as follows: 1603 cpm for CD4 cells, 399 cpm for CD8 cells, 6430 cpm for CD8 cells with 10% TCGF (prepared from Con A-activated rat spleen cells) and APC.

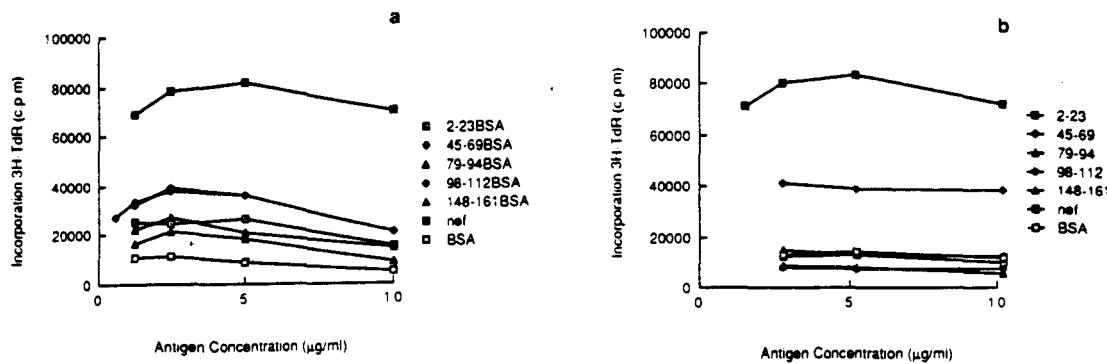


Fig. 2. Proliferative response of T lymphocytes from rats immunized with the recombinant nef Ag. The lymph node T cells were taken 5 days after the last immunization, purified, and stimulated with the indicated peptides carried (a) or not (b) to BSA. The values are representative of one of the five experiments performed in triplicate ($SE < 10\%$). The backgrounds were 1496 cpm for T cells and 8166 cpm for T with APC.

experimental conditions. Therefore, after immunization of rats with the recombinant nef molecule only CD4 T lymphocytes proliferated *in vitro*.

Proliferative response of T lymphocytes to nef derived synthetic peptides

Rats. The proliferative response of inguinal T lymphocytes from rats (*LOU M*) immunized with the nef protein was determined after incubation with either the recombinant nef Ag or with the 2-23, 45-69, 79-94, 98-112 and 148-161 peptides, coupled or not to the BSA protein. All these peptides (according to their propensity to contain an amphipathic α -helix structure) stimulated the nef specific T cells when coupled, while no stimulation was observed with the carrier alone. The peptides 45-69-BSA and 98-112-BSA induced the highest proliferative responses (Fig. 2a). The proliferative response was not due to a mitogenic effect of the peptides, since no response was observed when T cells recovered from normal rats were used (data not shown). In addition, the 45-69 peptide was the only peptide that elicited a T cell proliferative response without being coupled to a carrier protein (Fig. 2b).

Chimpanzees. To extend the previous experiments, chimpanzees were immunized with the nef protein. The two controls B and J responded neither to nef protein nor to any peptide tested. The M chimpanzee PBL proliferated in response to the 45-69 peptide after the first immunization at days 22 and 30 (Fig. 3a), whereas the C chimpanzee PBL responded significantly, only after three immunizations, to the 45-69 peptide and also with 79-94 and 98-112 peptides (day 65) (Fig. 3b). A lower response to the 148-161 and 79-94 peptides was observed early after immunization, at days 11 and 22, respectively. Moreover, in these experiments, only the female C PBL proliferated, weakly, in response to the nef protein at day 22 and day 65 (data not shown). A T cell enriched population was prepared using the sheep red blood cell rosetting technique. Syngenic macrophages and B cells were used as APC, after treatment by mitomycin c (Fig. 4). Two weeks after the last immunization, M chimpanzee T cells responded only to nef and to the 98-112 peptide. In contrast, the nef protein and all the peptides tested induced proliferation of C chimpanzee T cells, the 45-69 and 98-112 peptides inducing the stronger response.

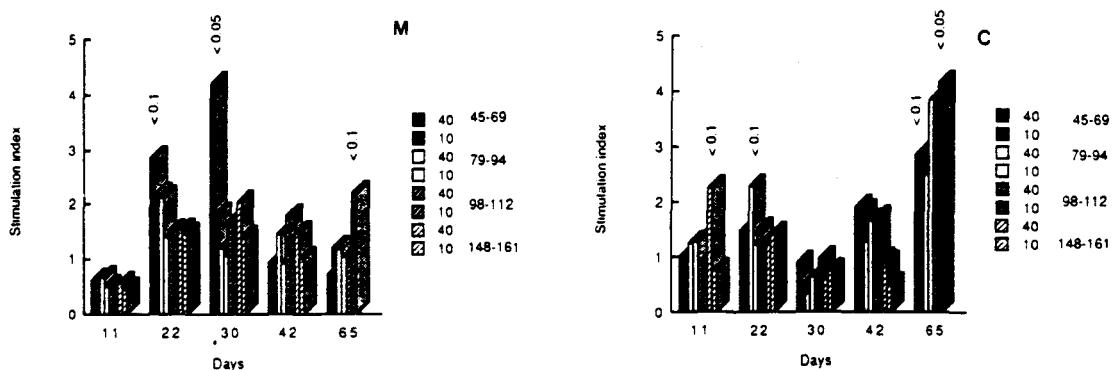


Fig. 3. Kinetics of PBL response in two chimpanzees. The female Cheetha (C) and the male Mgbadolite (M) were immunized with 100 μ g of nef protein using hydroxy alumin as adjuvant. The animals were boosted at days 22 and 42. The PBL (10^6) were restimulated *in vitro* with the indicated peptides at the concn of 40 and 10 μ g/ml. The tests were carried out in triplicates. The results were expressed in stimulation index (SI). p in comparison to $3H$ -TdR incorporated in PBL cultured without Ag.

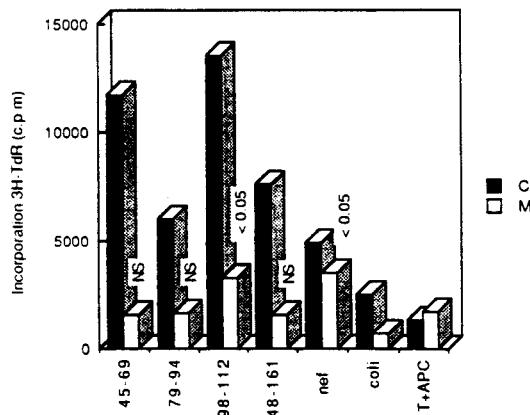


Fig. 4. T lymphocyte response (10^5) of chimpanzees immunized with the nef protein. 2 weeks after the fifth immunization (day 125). T lymphocytes were purified with sheep red blood cells as described in Materials and Methods. NS: not significant.

Characterization of the 45–69 peptide containing T-cell epitope

(a) *Generation of 45–69 peptide specific T cells.* Since the 45–69 peptide was able to restimulate *in vitro* rat and chimpanzee T cells either linked to a carrier molecule or alone, the existence of an immunogenic epitope contained in this region of the nef protein was probable. To confirm this hypothesis 45–69 specific peptide T cells were prepared. As shown in Fig. 5 these lymphocytes were strongly restimulated *in vitro* when incubated with the 45–69 peptide coupled to BSA or not, but also with the nef protein and not when the carrier alone or the control cytochrome c were used. Therefore, this peptide is immunogenic *in vivo* and contains at least one potent T cell epitope when tested in the rat model.

(b) *Identification of the minimal T cell epitope in the 45–69 peptide.* To determine the sequence carrying the immunological activity of 45–69 peptide three peptides overlapping this region (45–59, 50–64 and 55–69 peptides) were synthesized (Table 2) and tested for their capacity to restimulate *in vitro* T lymphocytes from rats immunized with the nef protein or with the 45–69

Table 2. Amino sequence of the different subfragments of the 45–69 peptide. The amino acid residues are indicated by the standard single letter code

| Peptide | Sequences of truncated forms of peptides 45–69 | |
|---------|------------------------------------------------|-----------------|
| | Sequence | Sequence |
| 45–69 | SSNTAATNAACAWLEAQEEEVGFP | |
| 45–59 | SSNTAATNAACAWLE | |
| 50–64 | | ATNAACAWLEAQEEE |
| 55–69 | | CAWLEAQEEEVGFP |
| 50–59 | | ATNAACAWLE |

peptide. In order to modulate their helical propensity without modifying their amino acid sequences (Gras-Masse *et al.*, 1988), all peptides were synthesized with two different amino-terminus groups: a free amino group (generated by the proteolytic step of the processing) which interacts unfavourably with the helix dipole or its N^{α} -acetylated (Nac) counterpart. Although the latter is artificial, it is more favorable to an α -helical folding. As the results in Fig. 6a shows, the 50–64 peptide strongly restimulated nef specific T lymphocytes. A weaker T lymphocyte proliferation was observed in response to the 45–59 peptide but was increased by the N^{α} -acetylation of the peptide. In contrast, the 55–69 peptide, whether N^{α} -acetylated or not, did not induce any response. Similar results (Fig. 6b) was obtained when using T lymphocytes recovered from animals sensitized with the 45–69 peptide. The response obtained with the 50–64 peptide was the strongest while the proliferative response obtained with the 45–59 peptide was weaker, and enhanced with the N^{α} -acetylated form of the peptide. Interestingly, the T cell response induced by the 50–64 N^{α} -acetylated peptide was as important as the one obtained using the 45–69 peptide used to immunize the animals. This peptide, although containing only 15 amino acid, was thus particularly antigenic *in vitro*.

As in the rat model the nef specific T cells of the two chimpanzees C and M proliferated when incubated with the 50–64 peptide. The stimulating effect of this sub-

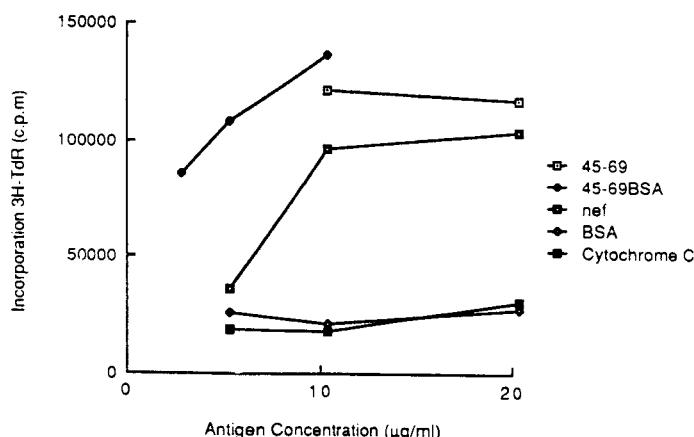


Fig. 5. Proliferative response to the nef protein of T cells from rats immunized with the 45–69 peptide. The cells were obtained from draining lymph nodes of LOU M rats 5 days after the last immunization. The background levels were 1285 cpm for T cells and 18,219 cpm for T cells with APC (representative of one of the three experiments realized in triplicate, SE < 10%).

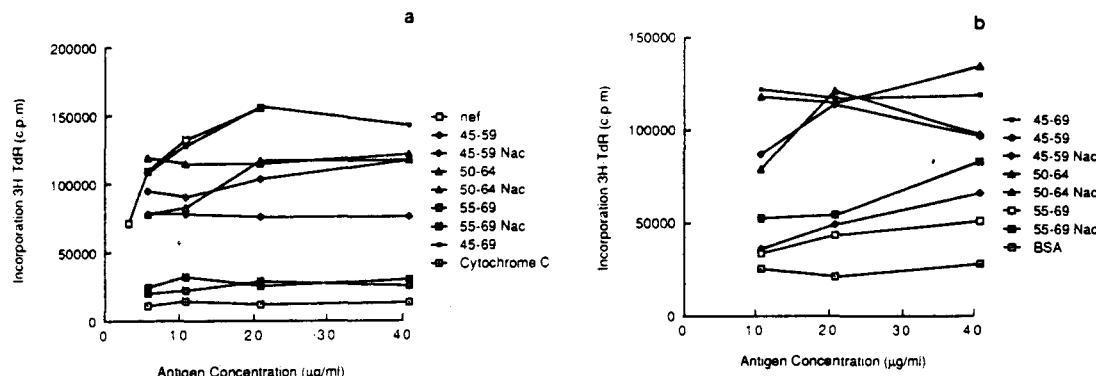


Fig. 6. Recognition of overlapping peptides from the 45-69 peptide by rat lymph node T cells of rats immunized with either (a) nef protein or (b) 45-69 peptide. The peptides used were N^{α} -acetylated or not. The background were, respectively, (a) 10,710 cpm and (b) 18,219 cpm for T cells with APC.

subfragment was even more remarkable than the one of the 45-69 peptide itself (data not shown).

Then, we have immunized *LOU M* rats with the N^{α} -acetylated form of the 50-64 peptide. Proliferation was induced by the 50-64 or 45-69 peptides, and by the nef protein (Fig. 7). In contrast, BSA, cytochrome c or *E. coli* used as controls did not stimulate these T lymphocytes. Thus, the 50-64 peptide was both antigenic and immunogenic.

The response induced by the overlapping 45-59 and 50-64 peptides could be due to an epitope which included the residues shared by both peptides. However, the possibility of two distinct epitopes in these peptides could not be excluded. We therefore synthesized the overlapping 50-59 peptide. Figure 8 shows that only the N^{α} -acetylated form of the 50-59 peptide was able to stimulate T lymphocytes from rats immunized with the nef protein, or with the 45-69 or 50-64 peptides.

Conformational studies

Occurrence of preferential secondary organization in the 45-69 and 50-64 N^{α} -acetylated peptides was monitored using circular dichroism study in aqueous medium (Fig. 9). As expected, the CD spectrum of the 45-69 peptide was characteristic of an helical organization,

with minima occurring at 208 and 222 nm. Helix content was calculated from the mean residue ellipticity at 222 nm and was about 30%. The CD spectrum of the shorter fragment 50-64 N^{α} -acetylated was characteristic of a β -pleated sheet structure. Thus, only the 45-69 peptide is long enough to fold in an α -helical structure. The peptide 50-64 as expected is too short to reach a similar organization and forms β -pleated sheets.

T cells specific for the 45-69 peptide containing epitope provide help for the production of anti-nef antibodies in vivo

The identification in the 45-69 peptide of a T cell recognition site able to induce and elicit nef specific T cell proliferative response prompted us to determine the ability of this peptide to induce functional helper T cell *in vivo*. This was determined in the *LOU M* rat model by measuring the *in vivo* antibody production after priming the animals with the 45-69 peptide or after transfer of 45-69 specific lymph node T cells, followed in both cases by challenge with the nef protein. The 45-69 peptide specific T cells were injected i.v. into syngeneic rats (15×10^6 cells/rats) 1 day before immunization with $10 \mu\text{g}$ of the recombinant nef protein. Figure 10a shows that the passive transfer strongly increased the

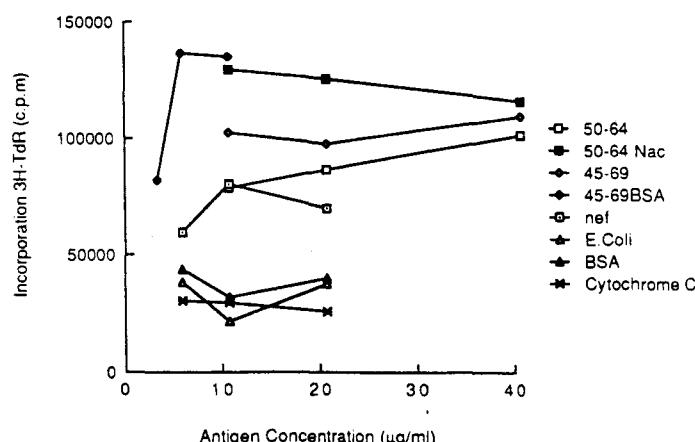


Fig. 7. Proliferative response to various concns of nef protein or the 45-69 peptide of T lymphocytes immunized with the N^{α} -acetylated 50-64 peptide. The *LOU M* rats were injected twice with $100 \mu\text{g}$ of the peptide. The background was 28,512 cpm for T cells with APC.

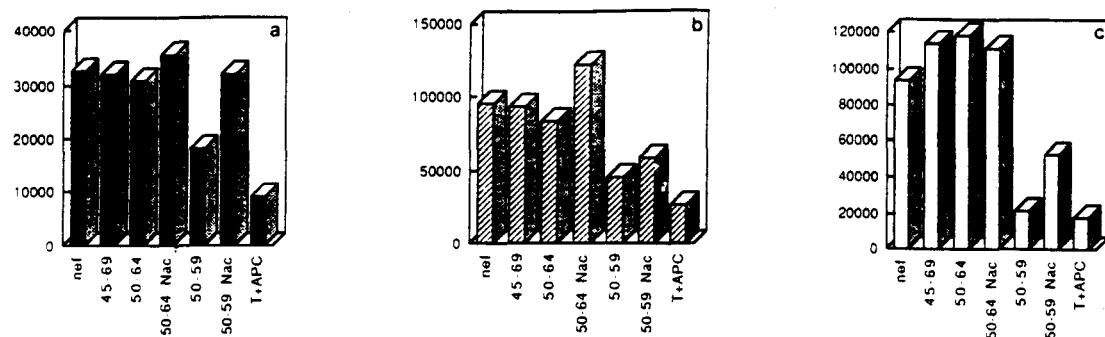


Fig. 8. Proliferative responses of lymph node T cells from rats immunized with (a) the nef protein, (b) the 45-69 peptide or the N^1 -acetylated 50-64 peptide. The response obtained with the N^1 -acetylated 50-59 peptide was higher than that obtained with the non-acetylated form (representative of one of the three experiments realized in triplicate).

production of nef specific IgG compared with sera of rats receiving enriched T cells specific for cytochrome c prepared according to the same protocol.

Similarly, the priming of rats with the 45-69 peptide before challenge with the nef protein ($10\ \mu\text{g}$ in IFA) led to a significant increase in anti-nef IgG production (Fig. 10b). Thus, a specific antibody response to the nef protein and to nef peptides other than the 45-69 peptide (data not shown) was induced. Moreover, this sequence contains a B cell epitope since nef antigen was recognized before priming. Therefore, the 45-69 peptide contains a potent epitope generating functional helper T cells involved in the production of anti-nef antibodies.

DISCUSSION

The purpose of this work was to determine the T helper cell epitopes of nef, using recombinant nef protein and synthetic peptides derived from the protein sequence. Our studies showed that the recombinant nef protein, when injected in Alum or in Freund's adjuvants, was able to induce a T cell response. T cell epitopes were

investigated by analysing the capacity of the peptides to restimulate T lymphocytes from animals immunized with the entire nef protein, and the capacity of peptide specific T lymphocytes to recognize the whole protein. Five peptides were first tested, each containing 15 or 25 residues. A highly immunogenic and antigenic peptide, the 45-69, is located in the *N*-terminal end of the nef molecule. The observation that this antigenic site is

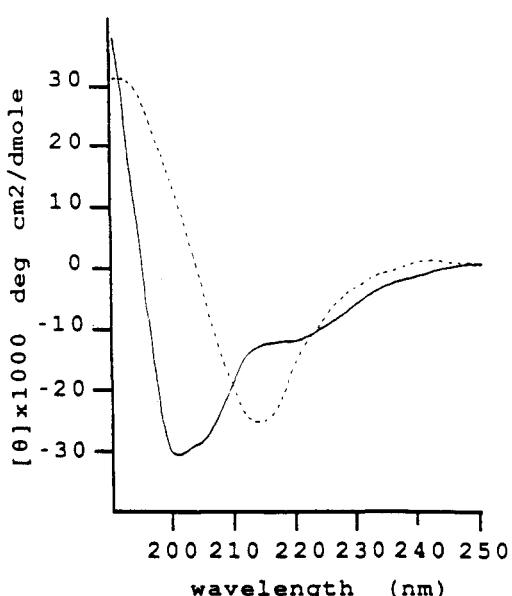
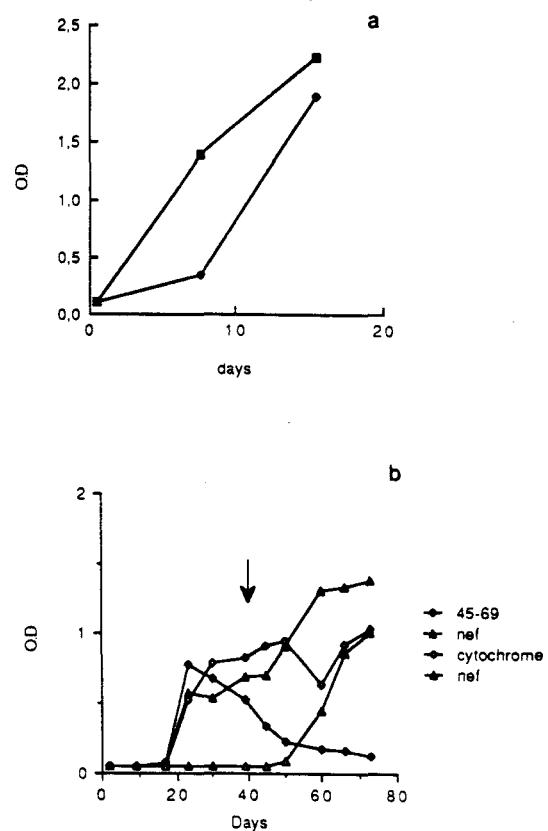


Fig. 9. Circular dichroism spectra of peptides 45-69 Nac (—) and 50-64 Nac (---) in aqueous medium (0.2 M NaCl).

Fig. 10. Nef protein specific IgG levels from a pool of sera (a) of three rats passively transferred with either 10^7 45-69 peptide specific T cells (■) or nef protein (●) or cytochrome T specific cells as control (○), 1 day before their immunization with $10\ \mu\text{g}$ of the nef protein; (b) of three rats preimmunized twice either with the 45-69 peptide (tested against nef ▲ and 45-69 peptide ●) or with cytochrome c as control (tested against nef △ and cytochrome c ○) and then boosted with $10\ \mu\text{g}$ of the nef protein (see the arrow).

recognized by nef specific T cells from different species such as rats and chimpanzees, is reminiscent of findings concerning the env-T1 of the HIV-1 envelope in mice (Cease *et al.*, 1987), monkeys (Hosmalin *et al.*, 1989) and humans (Berzofsky *et al.*, 1988) or the malaria CSP sites in mice (Good *et al.*, 1987) and humans (Good *et al.*, 1988).

In the rat model, the 45–69 peptide was able to induce a nef proliferation of T cells from animals immunized with the nef without being linked to a carrier protein. In contrast, the other peptides (2–23, 79–94, 98–112 and 148–161) were able to elicit a T cell proliferation only when associated to a carrier protein (BSA), the carrier exhibiting no stimulatory effect by itself. After immunization with the 45–69 peptide, a specific response was induced both to the peptide and to the whole protein. The peptide, which was immunogenic even when not coupled to a carrier protein, contains an epitope for T cells with a helper function *in vivo*. This was concluded since priming with the peptide or transfer of 45–69 peptide specific T lymphocytes into naive rats enhanced the anti-nef IgG response following injection of the nef protein. Interestingly, priming with this single determinant and boosting with the nef protein also lead to the enhancement of the antibody response to other determinants of the protein (data not shown).

In a non-human primate model, the uncoupled 45–69 peptide induced a significant proliferation of T cells from animals immunized with the entire nef molecule. A late response of chimpanzee T cells to the 98–112 peptide was also observed and probably reflected a dynamic aspect of the anti-nef immune response. The 98–112 peptide was also antigenic in the rat, but required in this model the linking to a carrier protein in order to induce a recall T lymphocyte proliferation. A comparison with a similar recent report (Bahraoui *et al.*, 1990) is however difficult in view of the difference of adjuvants used for immunization. Nevertheless, the antigenic 176–206 peptide described by these authors was also observed in our rat model to be an antigenic peptide (data not shown).

In our experiments, we used thymic-cells as APC in the rat model while in the chimpanzee model APC were peripheral blood mononuclear cells. This could account for differences in the requirement of some peptides to be linked to a carrier molecule since the processing and the presentation of the antigen by these APC might be different. Moreover, some experiments are necessary to clarify the epitopes in regards to the MHC restriction despite the common major epitope (45–69) response in two chimpanzees and one rat strain.

The minimal active site of the 45–69 peptide was investigated by synthesizing different peptides overlapping this region, and was identified as the N^{α} -acetylated form of the 50–59 peptide, while the free amino form was inactive. The structure of the peptides was investigated by circular dichroism analysis and showed a partial α -helical organization in the case of 45–69. In the case of its 50–64 subfragment a β -sheet structure was observed, strongly suggesting the formation of aggregates due to the high hydrophobicity of the 50–64 peptide.

Nevertheless, both peptides (45–69 and 50–64 Nac) were immunogenic and T cell epitopes. This propensity could be enhanced in an helix forming environment. Such an environment might be provided by the groove of the MHC class II molecules (Brown *et al.*, 1988). The 50–64 sequence although too short to fold as an helix by itself, at least in aqueous solution, has probably a high potential to reach such an α -helical conformation when integrated in a longer peptide.

This suggests that criteria used to detect potential T cell epitopes should take into account the α -helical propensity of the sequences rather than their actual α -helical organization in aqueous media. However, other conformations could be implied in their interaction with MHC class II. Margalit *et al.* (1987) have been shown that only 75% of immunodominant T cell determinants exhibit amphipathic α -helix structure. Moreover, Sette *et al.* (1989) failed to correlate the propensity of the antigenic peptide (OVA 323–336) to form secondary structures with its capacity to bind MHC molecules.

Nevertheless, the importance of the α -helical propensity is underlined by the influence of the nature of the *N*-terminus group of the 50–59 minimal peptide; indeed, only the N^{α} -acetylated form of 50–59 was recognized by T cells specific for nef protein, for 45–69 Nac or for 50–64 Nac. The presence of a positively charged function at the -NH₂ end is known to greatly decrease the helical organization by interacting unfavourably with the helix dipole generated by hydrogen bonding along the axis of the helix. Thus, although their side chains are identical, the 50–59 Nac peptide that is antigenic has a greater stability than the non-acetylated form. Although this explanation is consistent with structural aspects, these data could also be interpreted in terms of protection toward an excessive processing of the antigen, involving aminopeptidases whose action would be impeded by the acetyl group. Carbone *et al.* (1987) have observed that protected fragments in a hydrophobic environment such as the inner side of the plasma membrane will tend to form an α -helix. Wraith *et al.* (1989) have shown an optimal interaction between one peptide of Myelin Basic Protein (MBP) and the MHC molecule when the MBP peptide was acetylated. Recently, Mutch *et al.* (1991) described also that the response towards tetanus toxoid peptides was significantly increased by acetylation at the amino-terminus, suggesting that acetylation had a direct enhancing effect on the binding interaction between the suboptimal peptide and the presenting MHC molecule or TCR. The 45–69 peptide residues involved in the agretope or the epitope recognition are presently under investigation.

In conclusion, the identification of nef T helper epitopes that could allow the priming of T cells for lymphokine production leading to enhanced humoral and cell mediated immune response might be useful for the design of HIV vaccines. There is increasing evidence that cytotoxic T lymphocytes might participate to the control of HIV infection (Martz and Howell, 1989; Walker *et al.*, 1986). It would therefore be important to investigate which T helper cell epitopes are able to

induce CTL responses, and whether defined epitopes could be recognized by both helper and cytotoxic T lymphocytes.

Acknowledgements—We thank I. Wolowczuk and L. Bedjahaga for their help, A. Murray for reviewing the manuscript and P. Bussi, N. Orbell and I. Orbell for assistance with veterinary care, immunization and blood sample collections from chimpanzees.

REFERENCES

- Ahmad N. and Venkatesan S. (1988) Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**, 1481–1485.
- Allan J., Coligan J., Lee T., McLane M., Kanki P., Groopman J. and Essex M. (1985) A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science* **230**, 810–813.
- Antoni G. and Presentini R. (1989) A least-squares computer method for the determination of the molecular ratio of conjugates between two different proteins from the results of the amino acid analysis. *Analyt. Biochem.* **179**, 158–161.
- Ameisen J., Guy B., Chamaret S., Loche M., Mouton Y., Neyrinck J., Khalife J., Leprevost C., Beaucaire G., Boutillon C., Gras-Masse H., Maniez M., Kiely M., Laustriat D., Berthier A., Mach B., Montagnier L., Lecocq J. and Capron A. (1989) Antibodies to the nef protein and to nef peptides in HIV-1 infected seronegative individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**, 279.
- Arya S. and Gallo R. (1986) Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2209–2213.
- Ashwell J. and Schwartz R. (1986) T-cell recognition of antigen and the Ia molecule as a ternary complex. *Nature* **320**, 176–179.
- Bahraoui E., Yagello M., Billaud J., Sabatier J., Guy B., Muchmore E., Girard M. and Gluckman J. (1990) Immunogenicity of the human immunodeficiency virus (HIV) recombinant nef gene product. Mapping of T-cell and B-cell epitopes in immunized chimpanzees. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**, 1087.
- Barré-Sinoussi F., Chermann J., Rey F., Nugeyre M., Chamaret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. and Montagnier L. (1984) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868–871.
- Berzofsky J. (1985) Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* **229**, 932–940.
- Berzofsky J., Bensussan A., Cease K., Bourge J., Cheynier R., Lurhuma Z., Salaun J., Gallo R., Shearer G. and Zagury D. (1988) Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* **334**, 706–708.
- Brown J., Jardetzky T., Saper M., Samraoui B., Bjorkman P. and Wiley D. (1988) A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* **332**, 845–850.
- Carbone F., Fox B., Schwartz R. and Paterson Y. (1987) The use of hydrophobic, α -helix-defined peptides in delineating the T cell determinant for pigeon cytochrome c. *J. Immun.* **138**, 1838–1844.
- Cease K., Margalit H., Cornette J., Putney S., Robey W., Ouyang C., Streicher H., Fischinger P., Gallo R., DeLisi C. and Berzofsky J. (1987) Helper T cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 4249–4253.
- Cheng-Mayer C., Ianello P., Shaw K., Luciw P. and Levy J. (1989) Differential effect of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**, 1629–1632.
- Chou Y. and Fasman D. (1974) Conformational parameters for amino acids in helical, β sheet and random coil regime calculated from proteins. *Biochemistry* **13**, 211–221.
- Cullen B. and Greene W. (1989) Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* **58**, 423–426.
- Culmann B., Gomard E., Kiely M., Guy B., Dreyfus F., Saimot A., Sereni D. and Levy J. (1989) An antigenic peptide of the HIV-1 NEF protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules. *Eur. J. Immun.* **19**, 2383–2386.
- DeLisi C. and Berzofsky J. (1985) T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7048–7052.
- Durda P., Leece B., Jenosski A., Rabin H., Fisher A. and Wong-Staal F. (1988) Characterization of murine monoclonal antibodies to HIV-1 induced by synthetic peptides. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**, 331–341.
- Eisenberg D., Weiss R. and Terwilliger T. (1982) The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **299**, 371–374.
- Fauci A. (1988) The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**, 617–622.
- Franchini G., Robert-Guroff M., Wong-Staal F., Ghrayeb J., Kato L., Chang T. and Chang N. (1986) Expression of the protein encoded by the 3' open reading frame of human T-cell lymphotropic virus type III in bacteria: demonstration of its immunoreactivity with human sera. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5282–5285.
- Gallo R., Salahuddin S., Shearer G., Kaplan M., Haynes B., Palker T., Redfield T., Oleske J., Safai B., White G., Foster F. and Markham P. (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500–503.
- Good M., Maloy W., Lunde M., Margalit H., Cornette J., Smith G., Moss B., Miller L. and Berzofsky J. (1987) Construction of synthetic immunogen: use of a new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* **235**, 1059–1062.
- Good M., Pombo D., Quakyi I., Riley E., Houghten R., Menon A., Alling D., Berzofsky J. and Miller L. (1988) Human T cell recognition of the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum. Immunodominant T cell domains map to polymorphic regions of the molecule. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1199–1203.
- Gras-Masse H., Jolivet M., Drobecq H., Aubert J., Beachey E., Audibert F., Chedid L. and Tartar A. (1988) Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Molec. Immun.* **25**, 673.
- Guy B., Kiely M., Riviere Y., Le Peuch C., Dott K., Girard M., Montagnier L. and Lecocq J. (1987) HIV F'3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266–269.
- Hammes S., Dixon E., Malim M., Cullen B. and Greene W. (1989) Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9549–9553.

- Heber-Katz E., Hansburg D. and Schwartz R. (1983) The Ia molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J. Molec. cell. Immun.* **1**, 3-14.
- Hosmalin A., Nara P., Zweig M., Cease K., Gard E., Markham P., Putney S., Daniel M., Desrosiers R. and Berzofsky J. (1989) Enhancement of an antibody response to the envelope glycoprotein of HIV-1 in primates by priming with helper T-cell epitope peptides. In *Vaccines 89: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* (Edited by Lerner R. et al.), p. 121. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Julius M., Simpson E. and Herzenberg L. (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immun.* **3**, 645-649.
- Kim S., Ikeuchi K., Byrn R., Groopman J. and Baltimore D. (1989) Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9544-9548.
- Khalife J., Guy B., Capron M., Kiény M., Ameisen J., Montagnier L., Lecocq J. and Capron A. (1988) Isotypic restriction of the antibody response to human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **4**, 3-9.
- Koenig S., Fuerst T., Wood L., Woods R., Suzich J., Jones G., De La Cruz V., Davey M., Venkatesan S., Moss B., Biddison W. and Fauci A. (1990) Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immunol.* **145**, 127-135.
- Levy J., Hoffman A., Kramer S., Landis J., Shimabukuro J. and Oshiro L. (1984) Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842.
- Luciw P., Cheng-Mayer C. and Levy J. (1987) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 1434-1438.
- Margalit H., Spouge J., Cornette J., Cease K., DeLisi C. and Berzofsky J. (1987) Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immun.* **138**, 2213-2229.
- Martz E. and Howell D. (1989) CTL: virus control cells first and cytolytic cells second? *Immun. Today* **10**, 79-86.
- McSharry J., Costantino R., Robbiani E., Echols R., Stevens R. and Lehman J. (1990) Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. clin. Microbiol.* **28**, 724-733.
- Merrifield R. (1963) Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149.
- Mikamo S. (1988) A novel method for the purification of sheep red cell rosetting lymphocytes. *J. Immun.* **107**, 189-196.
- Mutch D., Rodda S., Benstead M., Valerio R. and Geysen H. (1991) Effects of end groups on the stimulatory capacity of minimal length T cell determinant peptides. *Peptide Res.* **4**, 132-137.
- Niederman T., Thielan B. and Ratner L. (1989) Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1128-1132.
- Ranki A., Valle S., Krohn M., Antonen J., Allain J., Leuther M., Franchini G. and Krohn K. (1987) Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* **i**, 589-593.
- Robert-Guroff M., Popovic M., Gartner S., Markham P., Gallo R. and Reitz M. (1990) Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* **64**, 3391.
- Rothbard J. and Taylor W. (1988) A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* **7**, 93-100.
- Schwartz R. (1985) T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *A. Rev. Immun.* **3**, 237.
- Sedlak J. and Lindsay R. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analyt. Biochem.* **25**, 192.
- Sette A., Lamont A., Buus S., Colon S., Miles C. and Grey H. (1989) Effect of conformational propensity of peptide antigens in their interaction with MHC class II molecules. *J. Immun.* **143**, 1268-1273.
- Spouge J., Guy R., Cornette J., Margalit H., Cease K., Berzofsky J. and DeLisi C. (1987) Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. *J. Immun.* **138**, 204-212.
- Tam J. and Merrifield R. (1987) Strong acid deprotection of synthetic peptides: mechanisms and methods. In *The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9. Academic Press, Orlando, Florida.
- Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S. and Alizon M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus. LAV. *Cell* **40**, 9-17.
- Wraith D., Smiley D., Mitchell D., Steinman L. and McDevitt H. (1989) Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* **59**, 247-255.
- Walker C., Moody D., Stites D. and Levy J. (1986) CD8⁺ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science* **234**, 1563-1566.

ARTICLE 2

Determination of B-cell epitopes of nef VIH-1 protein: Immunogenicity related to their structure

Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J.C., Gras-Masse H., Delanoy A., Lecocq J.P., Dixson A., Tartar A., Capron A., and C. Auriault.

Molecular Immunology, 1992, 29, 1337-1345.

Après avoir montré que l'immunisation par la protéine nef induit un répertoire T, nous avons de la même manière tenté de définir le répertoire B. Ainsi, à la fois chez la souris Balblc (H-2), le rat Lou M (RT-1^u), le rat Fischer (RT-1^{iv1}) ainsi que chez les deux chimpanzés immunisés par la protéine nef, la réponse humorale ainsi que les épitopes B reconnus par les anticorps dirigés vis-à-vis de la protéine nef ont été étudiés.

Les deux techniques utilisées sont d'une part la technique dite d'immuno empreinte ou western blott et d'autre part un test ELISA. Brièvement, la protéine nef recombinante après migration sur gel de polyacrylamide est transférée sur membrane de nitrocellulose. Les anticorps, fixés à la membrane sont révélés par réaction enzymatique (technique de western blott). Quant au test ELISA, les peptides ainsi que la protéine nef sont fixés sur une plaque de polystyrène. Les anticorps après incubation sont détectés et révélés après réaction enzymatique.

Les résultats obtenus sont les suivants:

1) La protéine nef induit des anticorps spécifiques dans les trois espèces (rat, souris et chimpanzé) immunisées par la protéine; la réponse humorale chez le chimpanzé restant stable sur plus de quatre mois.

2) L'utilisation des peptides synthétiques 45-69, 79-94, 98-112 et 148-161 (identiques à ceux utilisés pour l'étude des épitopes T) ainsi que deux autres peptides:

- le peptide 66-80, région hautement conservée de la protéine nef,

- le peptide 176-206 représentant la partie C-terminale de la protéine nef démontrée par Bahraoui *et al.* (1990) comme un épitope B et T potentiel; a permis de mettre en évidence chez la souris Balb/c ainsi que chez les deux espèces de rat, Fisher et Lou M, deux sites majeurs de reconnaissance par les anticorps anti-nef à savoir les régions 45-69 et 176-206.

En outre, une troisième région 148-161 est reconnue par ces anticorps anti-nef, si ce peptide est synthétisé couplé à une protéine porteuse ou à un groupement de résidus poly-L-Lysine dénommé "MAP" (Multiple Antigenic Peptide). Ces structures permettent d'accroître l'antigénicité soit en augmentant le nombre de molécules accessibles aux anticorps soit en modifiant la configuration de la structure peptidique à l'image de celle présente dans la protéine.

Chez le chimpanzé, si les peptides 45-69 et 176-206 s'avèrent une nouvelle fois antigéniques puisqu'ils sont reconnus par les anticorps anti-nef, un troisième

peptide, 79-94, est également reconnu par les anticorps anti-nef.

3) L'immunisation de rats Lou M ou Fisher avec ces différents peptides, a permis de mettre en évidence deux structures immunogènes conduisant à la production d'anticorps spécifiques. Ils s'agit des peptides 45-69 et 176-206. De plus, ces anticorps reconnaissent la protéine nef soit par ELISA soit par immunoempreinte.

4) L'utilisation de sous-fragments des deux régions 45-69 et 176-206: les peptides 45-59, 50-64, 55-69 et les peptides 176-185, 181-191, 183-199, 184-195, 188-201 et 192-206, a permis de préciser la localisation du site de reconnaissance par ces anticorps. Ainsi, les régions 55-69 et 192-206 sont les sites de reconnaissance.

5) L'immunisation par les sous-fragments du peptide 45-69 tout particulièrement le peptide 50-64 a conduit à la production d'anticorps spécifiques reconnaissant la protéine nef recombinante.

DETERMINATION OF B-CELL EPITOPEs OF nef HIV-I PROTEIN: IMMUNOGENICITY RELATED TO THEIR STRUCTURE*

JEROME ESTAQUIER,^{†¶} CHRISTOPHE BOUTILLON,[‡] JEAN-CLAUDE AMEISEN,[†]
HELENE GRAS-MASSE,[‡] ANNE DELANOYE,[†] JEAN-PIERRE LECOCQ,[§] ALAN DIXON,^{||}
ANDRE TARTAR,[‡] ANDRE CAPRONT and CLAUDE AURIAULT[†]

[†]Centre d'Immunologie des maladies transmissibles et allergiques, Unité Mixte INSERM
U167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France; [‡]Laboratoire de Chimie des Biomolécules,
URA-CNRS 1309, Institut Pasteur Lille, France; [§]Transgène SA, Strasbourg, France; and ^{||}Centre
de primatologie, Centre International de Recherches Médicales (CIRM) de Franceville, Gabon

(First received 23 January 1992; accepted in revised form 8 April 1992)

Abstract—Determination of the B-cell epitopes of the nef molecule encoded by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) was undertaken using a set of six synthetic peptides. Sequences that were both antigenic and immunogenic and stimulated the production of antibodies recognizing the full length molecule, were considered as B-cell epitopes. Two peptidic sequences were antigenic both in rodents (mice and rats) and in non-human primates (chimpanzee). They were located in the regions 45–69 and 176–206 of the nef molecule. Two additional antigenic sequences were determined, one in chimpanzees, region 79–94, and the second in rodents, region 148–161. Immunogenicity was investigated in the rodents. Only the 45–69 and 176–206 sequences were immunogenic, and specific antibodies present in the sera of the immunized animals reacted with the nef protein. Therefore, each of these two sequences could be considered as containing at least one B-cell epitope. The fine epitopic specificity was determined using subfragments of these two sequences and it was shown that the antigenic determinants were contained in the C-terminal region of each sequence overlapping with the T-cell epitopes. These results raised the importance of vicinity of B- and T-cell determinants and their immunogenicity.

INTRODUCTION

The *nef* gene of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) encodes for a GTP-binding phosphoprotein, the P27 (Allan *et al.*, 1985; Arya *et al.*, 1986; Franchini *et al.*, 1986; Guy *et al.*, 1987). This protein has been shown *in vitro* to down-regulate the CD4 cell surface expression (Guy *et al.*, 1987) and IL-2 mRNA (Luria *et al.*, 1991) and to play a possible role as a transcriptional silencer of HIV (Luciw *et al.*, 1987; Ahmad *et al.*, 1988; Niederman *et al.*, 1989; Cheng-Mayer *et al.*, 1989) but has led to controversial reports (Kim *et al.*, 1989; Hammes *et al.*, 1989). It is now accepted that *nef* may participate in the establishment and maintenance of latency of HIV provirus (Cullen *et al.*, 1989). Recently, Kestler *et al.* have indicated that *nef* plays a major role *in vivo* in the pathogenesis of AIDS. During the clinically silent phase that precedes AIDS in HIV infection, antibodies towards *nef* have been detected in about half of the infected individuals, early after infection (Ranki *et al.*, 1987; Reiss *et al.*, 1989; Ameisen *et al.*, 1989) and *nef* specific cytotoxic T-lymphocytes have been detected

(Culman *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1990). Moreover, among the other regulatory proteins (tat and rev), the *nef* protein is the preponderant transcript in infected cells (Robert-Guroff *et al.*, 1990). These observations suggested that the immune response against *nef* may participate in early destruction of HIV-infected cells before a major dissemination of the virus.

The possibility of using synthetic peptides as vaccines against viral, bacterial and parasitic diseases has evoked considerable interest during the last decade. It was shown that vaccination of animals with synthetic peptides could lead to the establishment of protective immunity against foot and mouth disease, influenza, hepatitis B, diphtheria, cholera and schistosomiasis (Steward *et al.*, 1987; Wolowczuk *et al.*, 1991). Such synthetic vaccines can elicit specific, humoral as well as cellular immune response, and, being defined at a molecular level, are characterizable and potentially safe. Unfortunately, peptide antigens are usually not, or only weakly immunogenic when used without coupling to a carrier molecule (Anderer *et al.*, 1963; Langbeheim *et al.*, 1976; Muller *et al.*, 1982; Niman *et al.*, 1983). However, such carriers are unacceptable for a clinical use; beside the risk of hyperimmune reaction to the carrier, or the epitopic suppression, peptide-protein conjugates suffer from the limitations of precision in structural descriptions, reproducibility, and immunological response. The same limitations also apply to preparations resulting from copolymerization of T- and B-cell epitopes (Leclerc

*This work was supported by ANRS, EEC (STD2 Program), the Republic of Gabon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

¶To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: MAP, multiple antigen peptide; L, Lou M rat strain; F, Fischer rat strain; B, BALB/c mice.

et al., 1987; Good *et al.*, 1987). Using such preparations a total loss of the relevant immunogenicity, i.e. ability to induce an immune response crossreactive to the parent protein, can be observed. For this reason, chemically unambiguous peptide immunogens, obtained by the multiple antigen methods (Posnett *et al.*, 1988; Tam *et al.*, 1989, 1990), or by modification by built-in immunoadjuvants to peptide antigens (Jung *et al.*, 1985; Bernard *et al.*, 1987; Wiesmüller *et al.*, 1989) have been proposed. However the efficiency of such constructs still rely on an adequate selection of peptide-bearing B- and T-cell epitopes.

We have previously determined the T-cell epitopes of the nef protein (Estaquier *et al.*, 1992). Among the peptides tested, the sequence 45–69 exhibited both antigenic and immunogenic properties for T-cells. The existence of collaborative interaction between B- and T-cells prompts us to investigate the B-cell epitopes of the nef regulatory protein recognized by the immune system. This was performed using the same synthetic peptides selected according predictive algorithms. We explored their antigenicity and immunogenicity and the capacity of the peptide specific antibodies to crossreact with the protein.

We show that two antigenic peptides, located in the region 45–69 and the C-terminal end of the molecule (region 176–206), are major B-cell epitopes and induce antibodies which crossreact with the nef protein. We discussed the possible correlation between the coexistence of B- and T-cell epitopes in the same peptidic sequence and its immunogenicity.

MATERIALS AND METHODS

Production of nef protein

The protein was produced as a non-myristilated molecule in *E. coli* from the HIV-1 strain LAV_{BRU} (purified at 96%). It was prepared by G. Cauet at Transgene S.A. (Strasbourg, France).

Peptide selection and synthesis

The secondary structure of the nef protein was predicted according to Chou and Fasman. Prediction of B-cell epitopes was based mainly on hydrophilicity, mobility, and accessibility criteria (Hoop and Woods, 1981; Janin, 1979; Ponnuswamy and Bhaskaran, 1984). Peptide sequences were as follow: 45–69 (CH₃-CO-NH-SSNTAAATNAACAWLEAQEEEVGFP-COOH), 66–80 (NH₂-VGFPVTPQVPLRPMT-COOH), 79–94 (NH₂-MTYKAAVDLSHFLKEK-COOH), 98–112 (NH₂-EGLIHSQRQRDILDL-COOH), 148–161 (NH₂-VEPDKVEEANKGEN-COOH), and 176–206 (NH₂-PEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNC-COOH).

Peptides were synthesized by the solid phase synthesis according to the Merrifield method (Merrifield, 1963) as previously described (Estaquier *et al.*, 1992). The 66–80 peptide and the subfragments of the 176–206 peptide were synthesized by Neosystem (Strasbourg, France), and kindly provided by ANRS.

Multiple antigenic preparation of the 148–161 peptide

The synthesis of the multiple antigen peptide (Posnett *et al.*, 1988) bearing the 148–161 sequence of nef was accomplished by a stepwise solid phase procedure as described previously (Wolowczuk *et al.*, 1991). The multiple antigen peptide (MAP) was cleaved from the resin support by the Low/High HF procedure to minimize side reactions. The final product was characterized by high performance gel chromatography. Amino acid analysis gave results in agreement with the expected composition.

Conjugation of synthetic peptides with a carrier protein

The 45–69 and 148–161 peptides were conjugated to BSA (Sigma) using glutaraldehyde (Merck) as homobifunctional cross-linking agent or 6-maleimidocaproic N-hydroxysuccinimide (MCS) (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) as heterobifunctional cross-linking agent as previously described (Estaquier *et al.*, 1992). The peptide content of each conjugate was determined by amino acid analysis compared to the aminoacid composition of BSA alone.

Animals

Male inbred LOU M or Fischer rats expressing respectively the RT-1^a and RT-1^b haplotype or male BALB/c mice (H-2^d) were used throughout the experiments. The animals were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur or purchased from C.S.E.A.L. (CNRS, Orléans, France). The chimpanzees used in these studies were four healthy animals: two females, Cheetah (C) and Julie (J), that were both 9 years old, and two males, Bakoumba (B) and Mgbadolite (M), there were 8 and 6 years old, respectively. They were maintained in the Centre International de Recherches Médicales, Franceville, Gabon.

Immunization procedures

Rodents were immunized at the base f the tail with either the recombinant LAV_{BRU} nef molecule (40 µg) or the peptide (100 µg) in complete Freund's adjuvant (CFA) (Disco). Fifteen days later, rats or mice were boosted using the same protocol with half of immunogen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA). Chimpanzees of each sex were assigned to either the nef protein or the *E. coli* aluminium hydroxide adjuvant (placebo group). The chimpanzees that received the recombinant nef protein were C and M while J and B animals received the placebo. All four chimpanzees received a total of five injections over a period of 4 months. For each immunization, 0.5 ml of either nef (100 µg/ml) or the placebo control was injected intramuscularly in the thigh, and 0.5 ml was injected subcutaneously in the arm.

Western blotting of SDS-PAGE

Western blotting was carried out on the recombinant nef protein separated by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using

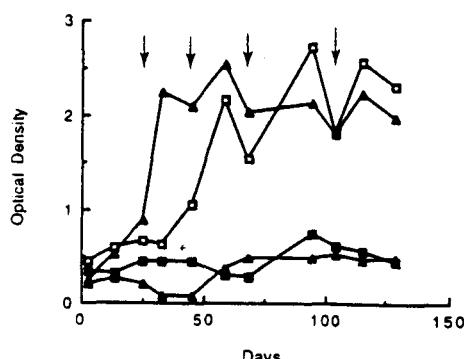


Fig. 1. Time course of appearance of nef specific IgG antibodies (1/50) in the sera of chimpanzees immunized either with the nef protein (C □ and M ▲) or *E. coli* placebo (J ■ and B △). Animals were boosted at days 22, 42, 65, 102 as indicated by the arrows

an LKB 2001 apparatus (Bromma, Sweden), then transferred to a 0.45 µm nitrocellulose sheet (Schleicher & Schull). After blotting, the strips were incubated with diluted sera and the fixed antibodies were detected with a peroxidase-labeled serum rabbit anti-rat IgG (ICN Biomedicals, Lisle, IL), or a mouse anti-human IgG (Diagnostic Pasteur, Marne La Coquette, France). The reaction was revealed with HRP color reagent (BIO-RAD).

Solid phase immunoassay procedure

Microtiter plate wells (Nunc, Denmark) were coated for 24 h at room temperature with 0.5 µg/0.1 ml of nef protein or synthetic peptides in 0.015 M

$\text{Na}_2\text{CO}_3/0.035 \text{ M NaHCO}_3$ buffer pH 9.6. A 2 h saturation at room temperature was then carried out by addition of 0.1 ml PBS (0.1 M) containing 5% milk. The plates were washed in PBS Tween 1% prior the addition of 0.1 ml of appropriate dilutions of sera to be tested. The plates were then incubated at room temperature for 24 h. After washings, IgG were revealed by a specific peroxidase-labeled sera with 10 mg/ml substrate (orthophenylenediamine, Sigma), in solution phosphate buffer 0.1 M, pH 5.5 containing H_2O_2 (1 ml/liter). The optical density (OD) was measured through a multichannel spectrophotometer at 492 nm. Results are expressed as the mean of duplicate wells (backgrounds were subtracted and were less than 0.1 OD).

RESULTS

Detection of anti-nef antibodies in sera from immunized animals

The kinetic studies of the antibody response from chimpanzees immunized with the recombinant nef protein (C and M) or placebo (J and B) were analyzed by ELISA. As reported in Fig. 1, after the second (M chimpanzee) or the third immunization (C chimpanzee), antibodies directed against the nef protein were detected. Immunological blotting analysis of the sera from chimpanzees immunized with the nef protein (Fig. 2A) showed that the antibodies produced recognized the 23 kDa recombinant nef protein while the sera of the animals immunized with the placebo did not.

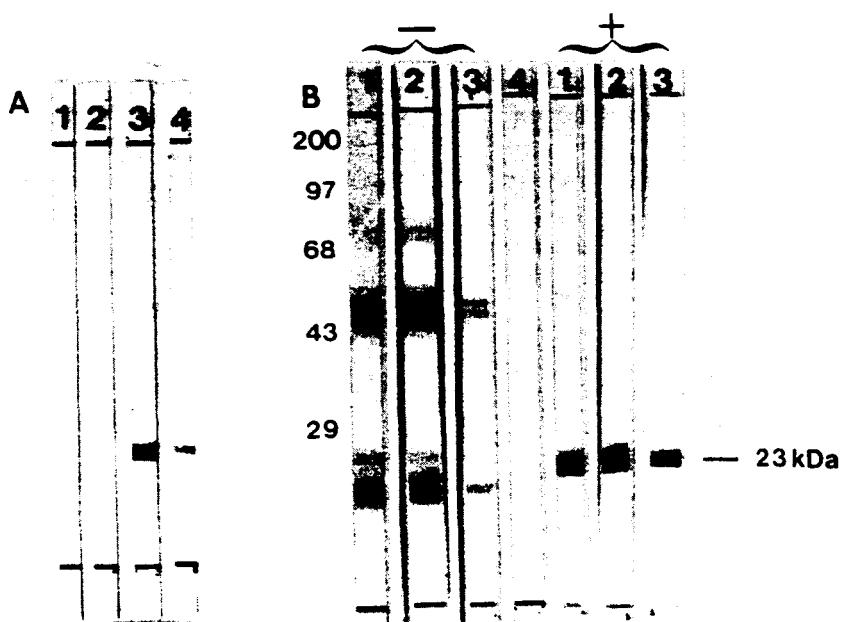


Fig. 2. Western blotting analysis. The nef recombinant protein was run on a 12% polyacrylamide gel either with (+) or without (-) β -mercaptoethanol and electrotransferred to a nitrocellulose sheet. Individual strips were incubated either with chimpanzee (A) or rat sera (B) (1–50); (A) lane 1: serum from the J chimpanzee immunized with *E. coli* placebo; lane 2: serum from the B chimpanzee immunized with the *E. coli* placebo; lane 3: serum from the M chimpanzee immunized with the nef protein; lane 4: serum from the C chimpanzee immunized with the nef protein; in (B) Lou M (Lane 1), Fischer (lane 2) rat strains and BALB/c mice (lane 3) immunized with the nef protein in Freund's adjuvant; lane 4: immunized with Freund's adjuvant alone.

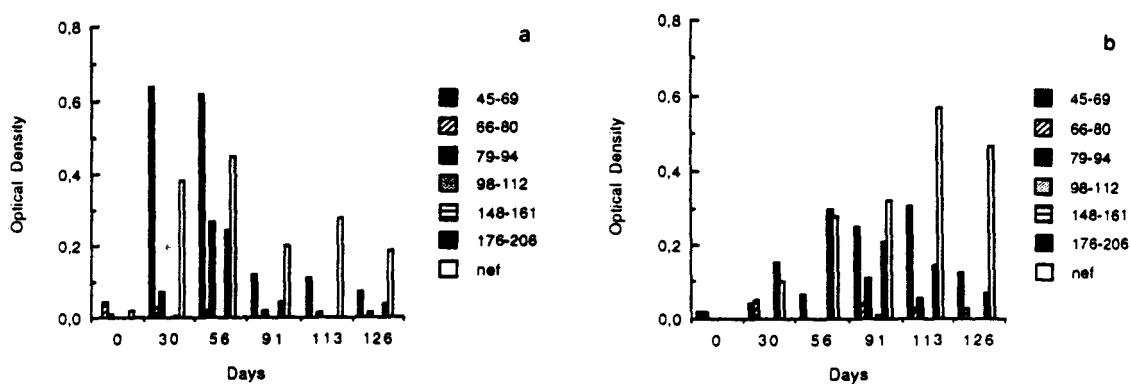


Fig. 3. Epitope mapping of the IgG specific nef antibodies (1/100) in individual positive chimpanzee M (a) and C (b) at various time following immunization with nef protein, determined by ELISA.

A pool of sera from rats (Fischer or Lou M strains) and mice (BALB/c) immunized with the nef protein associated with Freund's adjuvant recognized the nef protein while normal rat sera or sera from rats immunized with Freund's adjuvant alone did not (Fig. 2B).

Epitopes of nef recognized by antibodies

Six different sequences corresponding to putative linear epitopes of the nef protein were synthesized. Five peptides were selected according to predictive algorithms. The sixth (66–80) was selected because it represents a highly conserved region in HIV-1, HIV-2 and SIV. ELISA carried out using sera from the M chimpanzee (Fig. 3a) showed that antibodies bound to the 45–69, 79–94 and 176–206 peptides, and correlated with the nef antibody response when the protein was used as antigen. It is noteworthy that the response to the 45–69 peptide appeared earlier than the response directed towards the two other peptides. The response of the female (C) (Fig. 3b) appeared later and was directed first to the 176–206 peptide. Then, two other peptides were also recognized, the 45–69 and 79–94 peptides. Thus, these three peptides were recognized by the sera of both nef immunized chimpanzees.

ELISA carried out with the sera of rats immunized with the nef protein (Fig. 4), demonstrated that the

45–69 and 176–206 peptides were antigenic. The response directed against the 176–206 peptide was lower in Lou M than in Fischer rat strains. These two peptides were also antigenic in BALB/c mice. Recently, in our laboratory, Marguerite *et al.* have observed as previously described by Tam *et al.* (1990) that a construct based on the MAP (multiple antigen peptide) model, enhance the antigenicity of the peptides. This structure consisted of an octameric branching lysine core with eight dendritic arms and was applied in the case of the 148–161 peptide. Antigenicity of this peptide was tested free, coupled to BSA using glutaraldehyde or prepared as MAP. The results presented in Fig. 5 demonstrate that the antigenicity was increased when this peptide was coupled or in MAP form, both towards sera of rats and mice immunized with the nef protein.

Immunogenicity of peptides

The ability of using peptides as immunogens is of great interest in vaccine strategy. However, if they are used as analogues of an immunogenic region within a protein, antibodies to these peptides should be able to interact with the cognate protein. Thus, sera obtained after immunization of rats with various peptides were

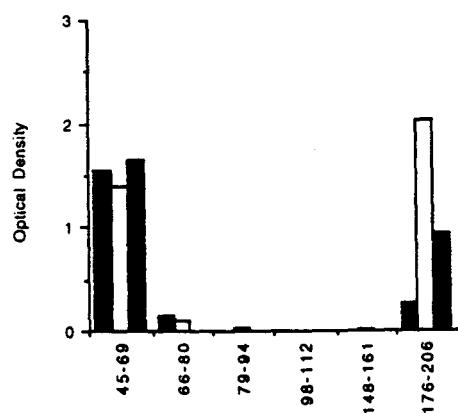


Fig. 4. Determination of the epitope recognized by sera from Fischer (□), Lou M (■) rat strains and BALB/c mice (■) immunized with the nef protein. A pool of sera of three animals (1/100) was tested in each case. Background was subtracted.

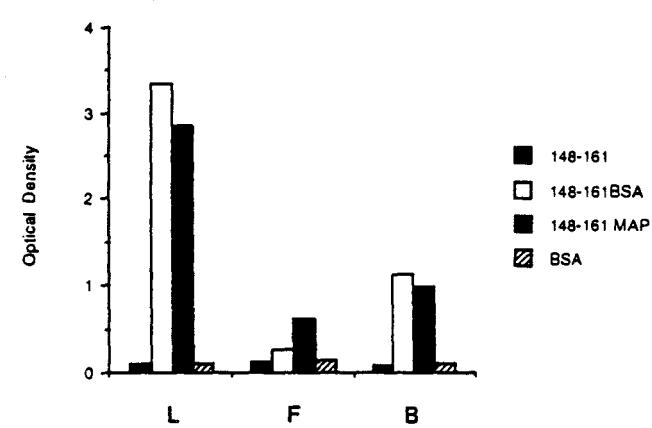


Fig. 5. Antigenicity of the 148–161 peptide construction. Peptide was used as free, coupled to the BSA protein or synthesized as MAP. IgG antibodies were tested by the ELISA method. Sera (1/50) from a pool of three rats (Lou M and Fischer) or five BALB/c mice immunized with the nef protein in Freund's adjuvant was used.

Table 1. Binding activity of antipeptide antibodies to homologous peptide and nef protein

| | Lou M _(RT-Iu) | Fischer _(RT-IV) | |
|------------------------------|--------------------------|----------------------------|-----|
| Homolog peptides/nef protein | | | |
| 45-69* | +/+ | 45-69* | +/+ |
| 66-80* | -/- | 148-161 ⁺ | -/- |
| 98-112 ⁺ | -/- | 148-161BSA ⁺ | +/- |
| 148-161 ⁺ | -/- | 148-161MAP ⁺ | -/- |
| | | 176-206* | +/+ |

Antisera from rats were obtained after two (*) or three immunizations (+) with the peptide and diluted at 1/50 for ELISA.

tested using ELISA and western blotting analysis for their reactivity to the nef protein. We showed that only some peptides tested were immunogenic (Table 1). As expected, the mode of administration and presentation of the peptide was of great importance. The immunization with the free 148-161 peptide or its corresponding MAP failed to induce an antibody response (Table 1). Coupling of the peptide to the macromolecular carrier (BSA) was necessary. The 45-69 and 176-206 peptides were the only uncoupled peptides able to induce antibodies crossreacting with the nef protein in ELISA (Fig. 6a) and western blotting assays (Fig. 6b). Antibodies were elicited after two injections. Interestingly,

Table 2. Location of the fine antigenic sites on the 45-69 (a) and 176-206 (b) peptides

| | | Immunogen | | |
|-----|-----|-----------|---------|----------|
| | | nef | 45-69 | 45-69BSA |
| 45 | 69 | +++ | +++ | +++ |
| 45 | 59 | - | - | - |
| 50 | 64 | - | - | - |
| 55 | 69 | +++ | +++ | +++ |
| | | Immunogen | | |
| | | nef | 176-206 | |
| 176 | 206 | ++ | +++ | |
| 176 | 185 | - | - | |
| 181 | 191 | - | + | |
| 183 | 199 | - | + | |
| 184 | 195 | - | - | |
| 188 | 201 | - | - | |
| 192 | 206 | +++ | ++ | |

Antisera were obtained after two immunizations. Lou M (L), Fischer (F) rat strains and BALB/c mice (B) were immunized either with the nef protein or the peptides. Sera were tested (1/100) by ELISA.

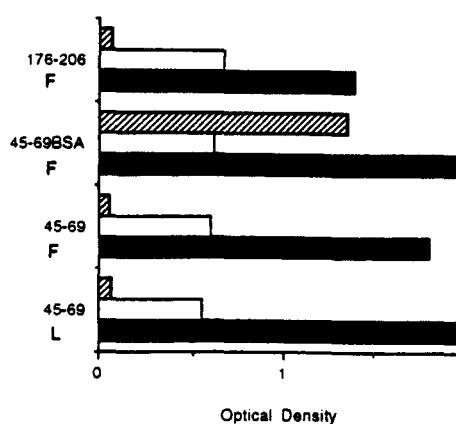


Fig. 6. (a) Immunogenicity of the 45-69 and 176-206 peptides. Sera from Lou M (L) or Fischer (F) rat strains immunized with the peptides or BSA were tested against homolog peptides (■), BSA (■), and nef protein (□) in ELISA (in each case a pool of three rats was used). (b) HIV-1 recombinant nef protein western blot. Lane 1: serum from Fischer rats immunized with Freund's adjuvant alone; lane 2: serum from Fischer rats immunized with the 176-206 peptide; lane 3: serum from Fischer rats immunized with the 45-69 peptide in presence of Freund's adjuvant; lane 4: serum from Fischer rats immunized with the 45-69 peptide coupled to the BSA. Sera were diluted at 1/50 for ELISA and western blotting assay.

antisera to the 45-69 peptide showed distinct reactivities when free peptide or coupled to BSA were used as immunogens. Indeed, the sera of animals immunized with the coupled 45-69 peptide recognized the aggregated form of the nef protein under low reducing condition while animals immunized with the free peptide recognized nef monomeric form in addition to the aggregates. Immunization using the 176-206 peptide induce antibodies that recognized only the monomeric form of the nef protein.

Analysis of the antigenic determinant in the 45-69 and 176-206 peptides

In order to define more precisely the region carrying the B-cell determinants of the 45-69 and 176-206

peptides, different sequences overlapping these regions were synthesized. We observed that the preponderant peptide recognized by antibodies elicited either by the nef protein or the coupled and uncoupled 45–69, in different strains (Lou M and Fischer rats or BALB/c mice), was the C-terminus end (region 55–69) of the 45–69 peptide (Table 2). Immunogenicity of these subfragments was tested in rodents and showed that all peptides were immunogenic with different intensities of antibody responses (Fig. 7a). The 55–69 peptide induced the strongest antibody response but the responses obtained with the 50–64 and the 45–59 peptides were

significant. However, in Lou M rats and in Fischer rats, only the antibodies directed to the 50–64 peptide cross-reacted with the nef protein as confirmed by western blotting analysis (Fig. 7b). The discrepancy between antigenicity and immunogenicity of both 50–64 and 55–69 peptides suggested that the B-cell determinant is not accessible, in solid phase assay, in the sequence 50–64 while this site is exposed in the sequence 55–69. Thus, the B-cell antigenic site is probably located in the region 55–64.

The characterization of the 176–206 epitope was also undertaken (Table 2). Nef specific or peptide specific antibodies recognized the C-terminus end (region 192–206) of the 176–206 peptide. However, immunization of Fischer rats, using the 176–206 peptide, generated antibodies directed against a second region, region 181–191.

DISCUSSION

The results presented here demonstrate that two regions of the nef protein are recognized by anti-nef antibodies from several species. These sequences, located in the regions 45–69 and 176–206 were also immunogenic, and able to induce a nef-specific B-cell response. Therefore, they can be considered as B-cell epitopes.

The determination of antigenicity of the 45–69 and 176–206 peptides as shown with sera of chimpanzees, rats and mice immunized either in Freund's adjuvant or alum hydroxide, is in agreement with results described by other authors (Gombert *et al.*, 1990; Bahraoui *et al.*, 1990). Moreover, using sera from HIV infected patients, Sabatier *et al.* (1990) showed that 84% of the sera recognized the C-terminus end, while 25% of the sera recognized the sequence 32–64. Therefore, the same major determinants were recognized after immunization or during natural infection, suggesting a possible privileged exposure of these sites to the immune system. The female as well as the male chimpanzee produced antibodies directed to the 79–94 peptide, while rodents produced antibodies to the 148–161 peptide. However, the antigenicity of the 148–161 peptide was only detected after coupling to a carrier protein or using MAP-presentation of the peptide, enhancing the sensitivity of the antigen-antibody interaction on solid surface (Tam *et al.*, 1989; Marguerite *et al.*, in press). Therefore, other B cell antigenic determinants probably exist alongside the nef protein.

In this report, we define for the first time immunogenic peptides of the nef HIV-1 regulatory protein. The 45–69 and 176–206 peptides that were potent antigen sites, were also immunogenic in a free form. The antibodies directed against the 45–69 and 176–206 peptides were also specific for the nef protein, since they recognized the recombinant molecule in a western blotting assay. The crossreactivity observed between the 45–69 peptide and the cognate protein suggests that the helical organization of this peptide, evidenced for the peptide using circular dichroism spectra analysis (Estaquier *et al.*, 1992), might be the conformation adopted in the context of the whole

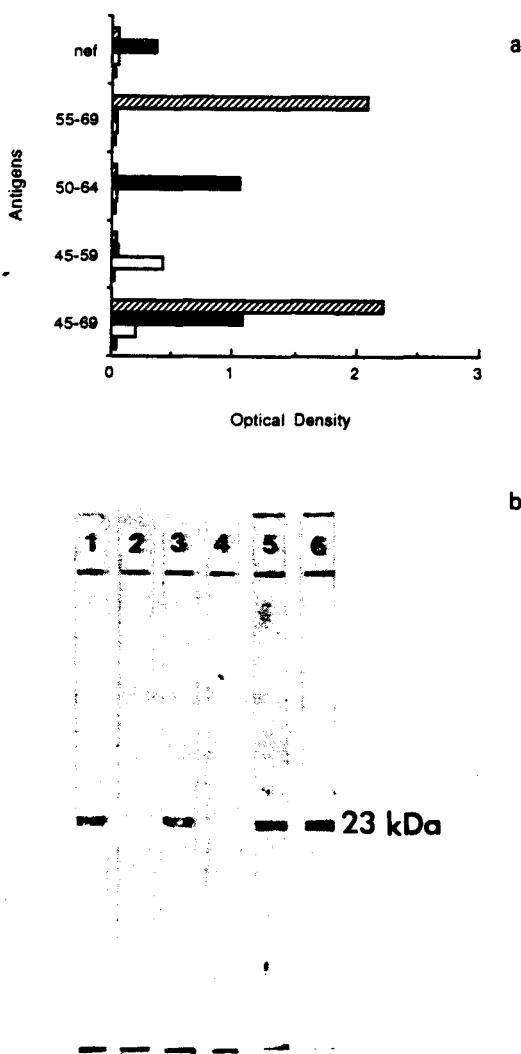


Fig. 7. Immunogenicity of the subfragments of the 45–69 peptide. Fischer rats were immunized two fold with each peptides (45–59, 50–64, 55–69). Antisera against 45–59 (□), 50–64 (▨), 55–69 (▨) and sera from animals immunized with adjuvant alone (■) were tested at 1/50 in ELISA (A) against peptide subfragments and against the nef protein, confirmed in western blotting assay (B). Lane 1: serum from Fischer rats immunized with the 45–69 peptide; lane 2: serum from Fischer rats immunized with the 45–59 peptide; lane 3: serum from Fischer rats immunized with the 50–64 peptide; lane 4: serum from Fischer rats immunized with the 55–69 peptide; lane 5: serum from Lou M rats immunized with the 45–69 peptide; lane 6: serum from Lou M rats immunized with the 50–64 peptide.

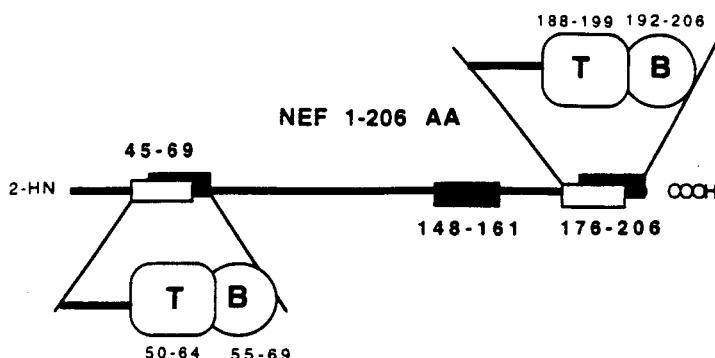


Fig. 8. Summary of our understanding of T- and B-cell recognition of the nef protein. Defined antibody-binding and T-cell recognition sites are represented respectively by solid and open boxes. The definition of the B- and T-cell determinant of the 45-69 and 176-206 peptides are represented by boxes (T) or circles (B).

protein. The antigenic sites of the 45-69 and the 176-206 peptides were located at the C-terminal end of each peptide. However, while all the 45-69 peptide subfragments tested induced an antibody response against the immunogenic peptide, only immunization with the 50-64 peptide induced antibodies that crossreacted with the nef recombinant protein, suggesting that this short fragment contains a major epitope of the protein. It has been observed that the majority of antibodies produced against intact immunogenic proteins recognize conformational determinants, which have in general hydrophilic primary structures folded into β -turns, β -sheets or α -helix (Dyson *et al.*, 1985; Schulze-Gahmen *et al.*, 1985; Dyson *et al.*, 1988). But, the definition of an immunogenic peptide is not a consequence of its antigenicity. Immunogenicity of these sequences was not clearly associated to particular physical characteristics. The immunogenicity of these peptides was not due to their size, since the sizes of the non-immunogenic and immunogenic peptides were equivalent. The 45-69 peptide or its subfragments and the 176-206 peptide were immunogenic in contrast to the 98-112 or 148-161 free peptides. The role played by the carrier was also important in eliciting a peptide-specific antibody response since in the case of the 148-161 peptide, only the coupled peptide was able to induce specific antibodies. Consequently, it might exist within the peptide some intrinsic characteristics that define its immunogenic capacities.

Several studies have suggested that T- and B-cell epitopes must be covalently linked for an efficient immune response (Leclerc *et al.*, 1987; Good *et al.*, 1987). In this context, it is worth noticing that the 45-69 and 176-206 peptides were also defined in our laboratory as containing T helper cell determinants. The T-cell determinants were located in the middle of the peptide while the B-cell determinants were in the C-terminal end (Fig. 8). Our results suggest a possible correlation between the coexistence of the B- and T-cell recognition sites in the peptide and its immunogenicity. Other observations support this hypothesis. The B-cell epitopes of influenza virus (Mils *et al.*, 1986), foot-and-mouth disease virus (Francis *et al.*, 1987) and the gag protein

of human immunodeficiency virus (Chong *et al.*, 1990) exhibit sequences overlapping with the T-cell epitopes.

Due to the MHC restriction of the immune response, a synthetic vaccine must bypass the various MHC haplotypes expressed in an outbred population. Here, we observed that the 45-69 and 176-206 peptides were antigenic in different species but also immunogenic in two genetically distinct rat strains, suggesting their high potential to elicit an immune response. Nevertheless, detailed analysis and comparison of the fine B- and T-cell recognition with other nef HIV strains are necessary to evaluate nef polymorphism, despite the well conservation of this protein (64% invariable amino acid residues in nef compared to the tat 48% and rev 54%).

The ability of synthetic peptides to prime the immune system towards a secondary stimulation with the pathogen is of great importance to immunologists working in the field of the vaccination against infectious agents. The identification of natural immunogenic peptides containing both B- and T-cell determinants is of particular interest in a vaccine strategy since such peptides would not require any manipulation and could bypass possible epitopic suppression associated with the carrier protein response (Herzenberg *et al.*, 1980; Herzenberg *et al.*, 1982; Schulze-Gahmen *et al.*, 1985).

Acknowledgements—We thank I. Wolowczuk for her helpful advice, A. Murray for reviewing the manuscript and P. Bussi, N. Orbell and I. Orbell for assistance with veterinary care and blood sample collections from chimpanzees.

REFERENCES

- Ahmad N. and Venkatesan S. (1988) Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**, 1481-1485.
- Allan J., Coligan J., Lee T., McLane M., Kanki P., Groopman J. and Essex M. (1985) A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science* **230**, 810-813.
- Ameisen J., Guy B., Chamaret S., Loche M., Mouton Y., Neyrinck J., Khalife J., Leprevost C., Beaucaire G., Boutilhon C., Gras-Masse H., Maniez M., Kieny M., Laustriat D.,

- Berthier A., Mach B., Montagnier L., Lecocq J. and Capron A. (1989) Antibodies to the nef protein and to nef peptides in HIV-1 infected seronegative individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **5**, 279.
- Anderer F. (1963) Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. *Biochim. biophys. Acta*. **71**, 246–248.
- Arya S. and Gallo R. (1986) Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2209–2213.
- Bahraoui E., Yagello M., Billaud J., Sabatier J., Guy B., Muchmore E., Girard M. and Gluckman J. (1990) Immunogenicity of the human immunodeficiency virus (HIV) recombinant nef gene product. Mapping of T-cell and B-cell epitopes in immunized chimpanzees. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **6**, 1087.
- Bernard J., Gras-masse H., Drobecq H., Tartar A., Lefrancier P., Hosmalin A., Carelli C. and Chedid L. (1987) Synthesis of conjugates between luteinizing releasing hormone (LH-RH) and N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) models of totally synthetic vaccines. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **29**, 455–463.
- Cheng-Mayer C., Ianello P., Shaw K., Luciw P. and Levy J. (1989) Differential effect of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**, 1629–1632.
- Chong P., Sia C., Sydor M. and Klein M. (1990) Identification of a potent synthetic HIV-1 immunogen compromising gag-P24 tandem T- and B-cell epitopes. *FEBS* **264**, 231–234.
- Chou Y. and Fasman D. (1974) Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222–245.
- Cullen B. and Greene W. (1989) Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* **58**, 423–426.
- Culmann B., Gomard E., Kieny M., Guy B., Dreyfus F., Saimot A., Sereni D. and Levy J. P. (1989) An antigenic peptide of the HIV-1 NEF protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules. *Eur. J. Immun.* **19**, 2383–2384.
- Dyson J., Rance M., Houghten R., Wright P. and Lerner R. (1988) Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. *J. Mol. Biol.* **201**, 201–217.
- Dyson J., Cross K., Houghten R., Wilson I., Wright P. and Lerner R. (1985) The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. *Nature* **318**, 480.
- Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J.-C., Gras-Masse H., Lecocq J.-P., Barbier B., Dixson A., Tartar A., Capron A. and Auriault C. (1992) T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (HIV-1) nef protein in rats and chimpanzees. *Molec. Immun.* **29**, 489–499.
- Franchini G., Robert-Guroff M., Wong-Staal F., Ghrayeb J., Kato L., Chang T. and Chang N. (1986) Expression of the protein encoded by the 3' open reading frame of human T-cell lymphotropic virus type III in bacteria: demonstration of its immunoreactivity with human sera. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5282–5285.
- Francis M., Fry M., Rowlands D., Bittle J., Houghten R., Lerner R. and Brown F. (1987) Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* **61**, 1–6.
- Gombert F., Blecha W., Tahtinen M., Ranki A., Pfeirer S., Troger W., Braun R., Muller-Lantzsch N., Jung G., Rubsam-Waigmann H. and Krohn K. (1990) Antigenic epitopes of nef proteins from different HIV-1 strains as recognized by sera from patients with manifest and latent HIV infection. *Virology* **176**, 458–466.
- Good M., Maloy L., Lunde M., Margalit H., Cornette J., Smith G., Moss B., Miller L. and Berzofsky J. (1987) Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on Malaria circumsporozoite protein. *Science* **235**, 1059–1062.
- Guy B., Kieny M., Riviere Y., Le Peuch C., Dott K., Girard M., Montagnier L. and Lecocq J. (1987) HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266–269.
- Hammes S., Dixon E., Malim M., Cullen B. and Greene W. (1989) Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9549–9553.
- Herzenberg L., Tokuhisa T. and Herzenberg L. (1980) Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. *Nature* **285**, 664–667.
- Herzenberg L. and Tokuhisa T. (1982) Epitope-specific regulation. *J. exp. Med.* **155**, 1730–1740.
- Hopp T. and Woods K. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3824–3828.
- Janin J. (1979) Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **277**, 491–492.
- Jung G., Wiesmüller K., Becker G., Bühring H. and Bessler W. (1985) Increased production of specific antibodies by presentation of the antigen determinants with covalently coupled lipopeptide mitogens. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **10**, 872–873.
- Kestler H., Ringler D., Mori K., Panicali D., Seghal P., Daniel M. and Desrosiers R. (1991) Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651–662.
- Kim S., Ikeuchi K., Byrn R., Groopman J. and Baltimore D. (1989) Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 9544–9548.
- Koenig S., Fuerst T., Wood L., Woods R., Suzich J., Jones G., De La Cruz V., Davey R., Venkatesan S., Moss B., Biddison W. and Fauci A. (1990) Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immun.* **145**, 127–135.
- Langbeheim H., Arnon R. and Sela M. (1976) Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 4636–4640.
- Leclerc C., Przewlocki G., Schutze M. and Chedid L. (1987) A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants. *Eur. J. Immun.* **17**, 269–273.
- Luria S., Chambers I. and Berg P. (1991) Expression of the type 1 immunodeficiency virus nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5326–5330.
- Luciw P., Cheng-Mayer C. and Levy J. (1987) Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 1434–1438.
- Marguerite M., Bossus M., Mazingue C., Wolowczuk I., Gras-Masse H., Tartar A., Capron A. and Auriault C. (1992) Analysis of antigenicity and immunogenicity of five different chemically defined constructs of a peptide. *Molec. Immun.* **29**, 793–8000.

- Merrifield R. (1963) Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. am. Chem. Soc.* **85**, 2149.
- Mils K., Skehel J. and Thomas D. (1986) Extensive diversity in the recognition of influenza virus hemagglutinin by murine T helper clones. *J. exp. Med.* **163**, 1477-1490.
- Muller G., Shapira M. and Arnon R. (1982) Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc. natn Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 569.
- Niederman T., Thielan B. and Ratner L. (1989) Human immunodeficiency virus type I negative factor is a transcriptional silencer. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1128-1132.
- Niman H., Houghten R., Walker L., Reisfeld R., Wilson I., Hogle J. and Lerner R. (1983) Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. *Proc. natn Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 4949.
- Ponnuswamy P. and Bhaskaran R. (1984) Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. *Int. J. peptide protein Res.* **24**, 168-179.
- Posnett D., McGrath H. and Tam J. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. biol. Chem.* **263**, 1719-1725.
- Ranki A., Valle S., Krohn M., Antonen J., Allain J., Leuther M., Franchini G. and Krohn K. (1987) Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* **i**, 589-593.
- Reiss P., De Ronde A., Lange J., De Wolf F., Dekker J., Debouck C. and Goudsmid J. (1989) Antibody response to the viral negative factor (nef) in HIV-1 infection: a correlate of levels of HIV-1 expression. *AIDS* **3**, 227.
- Robert-Guroff M., Popovic M., Gartner S., Markham P., Gallo R. and Reitz M. (1990) Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immuno-deficiency virus type I in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* **64**, 3391.
- Sabatier J., Fontan G., Loret E., Mabrouk K., Rochat H., Gluckman J., Montagnier L., Granier C., Bahraoui E. and Van Rietschoten J. (1990) Large fragments of nef-protein and gp110 envelope glycoprotein from HIV-1. *Int. J. peptide protein Res.* **35**, 63.
- Schulze-Gahmen U., Prinz H., Glatter U. and Beyreuther K. (1985) Towards assignment of secondary structures by anti-peptide antibodies. Specificity of the immune response to a b turn. *EMBO J.* **4**, 1731-1737.
- Schutze M., Leclerc C., Jolivet M., Audibert F. and Chedid L. (1985) Carrier-induced epitopic suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immun.* **135**, 2319-2322.
- Steward M. and Howard C. (1987) Synthetic peptides, a next generation of vaccines? *Immun. Today* **8**, 51-58.
- Tam J. and Zavala F. (1989) Multiple antigen peptide. *J. Immun. Meth.* **124**, 53-61.
- Tam J., Clavijo P., Lu Y., Nussenzweig V., Nussenzweig R. and Zavala F. (1990) Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. exp. Med.* **171**, 299-306.
- Wiesmüller K., Jung G. and Hess G. (1989) Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* **7**, 29-33.
- Wolowczuk I., Auriault C., Bossus M., Boulanger D., Gras-Masse H., Mazingue C., Pierce R., Grezel D., Reid G., Tartar A. and Capron A. (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse and monkey. *J. Immun.* **146**, 1987-1995.

ARTICLE 3

Comprehensive delineation of antigenic and immunogenic properties of peptides derived from the nef VIH-1 regulatory protein

Estaquier J., Boutillon C., Gras-Masse H.,
Ameisen J.C., Capron A., Tartar A. and C.
Auriault.

Vaccine, 1993, 11: 1083-1092.

Le troisième manuscrit présenté dans cette thèse représente nos commentaires quant à la définition et la caractérisation des épitopes T et B de la protéine nef. Un certain nombre de ces points seront repris dans la partie discussion.

En outre, est présentée l'étude sur le peptide 176-206 et la caractérisation des épitopes T et B au sein de cette séquence, qui n'était présentée que partiellement dans les deux articles antérieurs.

Cette région: 1) est à la fois antigénique vis-à-vis des cellules T et des cellules B spécifiques de nef.

2) l'immunisation par ce peptide induit aussi bien des cellules T que des anticorps spécifiques capables de reconnaître la protéine recombinante.

3) la localisation des sites de reconnaissance B ou T à l'aide de sous fragments de cette région a démontré qu'il existait deux régions distinctes, l'une en 188-201 reconnue par les cellules T, l'autre en 192-206 reconnue les anticorps.

Comprehensive delineation of antigenic and immunogenic properties of peptides derived from the nef HIV-1 regulatory protein

J. Estaquier*†, C. Boutillon†, H. Gras-Masse†, J.-C. Ameisen*, A. Capron*,
A. Tartar† and C. Auriault*

The Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) nef regulatory protein, a protein involved in AIDS pathology, was used as a model to investigate and analyze B- and T-cell epitopes. In this paper, we describe the potential structural basis of antigenic and immunogenic reactivity of synthetic peptides derived from the macromolecular antigen. The relationship between B- and T-cell determinants in the context of regulatory mechanisms involved in immune recognition, while integrating recent data concerning MHC presentation. As a result of the recent progress in the field of peptide recognition and presentation, the potential of the peptide approach for constructing successful synthetic vaccines needs to be continuously re-evaluated.

Keywords: Ag presentation; synthetic peptides; B- and T-cell epitopes; HIV

The possibility of using synthetic peptides as vaccines against viral, bacterial and parasitic diseases has generated considerable interest and remains a major driving force stimulating much current research in the field of synthetic polypeptides¹. Recent advances in the preparation of synthetic peptides and their use as probes for antigenic structures allow the prediction of antigenic sites recognized by antibodies and by T cells.

B-cell antigenic sites are generally located on the protein surface, in a region of relatively high segmental flexibility and hydrophilicity²⁻⁷, having structures folded into β -turns, β -sheets or α -helix⁸⁻¹⁰. A statistical method based on these observations has been developed and used

for the prediction of the B-cell epitopes¹¹⁻¹⁴. T-cell recognition is more complex, since T-cell receptors do not bind antigen directly, but recognize foreign antigens in the form of peptide fragments bound to a molecule encoded in the major histocompatibility complex (MHC)¹⁵⁻²⁰. However, predictive algorithms have been established and used during the last decade. DeLisi, Berzofsky and colleagues²¹⁻²³ proposed that the amphipathic α -helix is a convenient structure for T-cell epitopes whereas Rothbard and Taylor²⁴, using a database of the published antigenic sites, observed that a very high percentage of these contained a simple structural pattern composed of four or five residues. A third approach proposed by Kourilsky and Claverie²⁵, was that a mark of a good T-cell epitope is a sequence that is different from anything found in the repertoire of self proteins. Recent data concerning peptides eluted from the MHC molecules now provide new information for understanding the T-cell immune response²⁶⁻²⁹.

The immunogenicity of synthetic peptides is not, however, always a consequence of their antigenicity. Indeed, peptide antigens are usually not, or only weakly, immunogenic when used without being coupled to a carrier protein³⁰⁻³³. Therefore, novel approaches in the area of synthetic immunogens that are able to induce both B- and T-cell immunity, crossreacting with the pathogens, are necessary in the design of synthetic vaccines. This paper reviews our studies on antigenic and immunogenic synthetic peptides derived from a protein encoded by the human immunodeficiency virus (HIV-1), the nef regulatory gene product, and discusses how these findings may contribute to an understanding of the molecular basis of immunogenicity.

THE NEF PROTEIN ANTIGEN

Human immunodeficiency virus (HIV) is the aetiological agent of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS)³⁴⁻³⁶. The HIV genome encodes for several virion structural proteins (gag, pol, env) and regulatory proteins (tat, rev, vpu, vpr and nef) that are absent from the virion but expressed in the infected cells. We have focused our

*Centre d'Immunologie des Maladies Transmissibles et Allergiques, Unité mixte Inserm U 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France. †Laboratoire de Chimie des Biomolécules, URA-CNRS 1309, Institut Pasteur, Lille, France.
To whom correspondence should be addressed. (Received 11 November 1992; revised 16 February 1993; accepted 20 February 1993)

Table 1 Physical characteristics of the nef peptides:

| | |
|---------|--------------------------------------------------------------------|
| 45–69 | CH ₃ -CO-NH-SSNTAATNAACAWLEAQEEEVGFP-CO-NH ₂ |
| 79–94 | NH ₂ -MTYKAVALSHFLKEK-COOH |
| 98–112 | NH ₂ - EGLIHSQRRODIDL -COOH |
| 148–161 | NH ₂ -VEPDVKVEEANKGEN-COOH |
| 176–206 | NH ₂ - PEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNC -COOH |

| | Peptide | | | | |
|--------------------|---------|-------|--------|---------|---------|
| | 45–69 | 79–94 | 98–112 | 148–161 | 176–206 |
| Hydrophilicity | 3 | 7 | 6 | 5 | 8 |
| Accessibility | 4 | <10 | 2 | 6 | 9 |
| Mobility | >10 | 6 | 3 | 9 | >10 |
| Helical nucleation | + | + | — | + | + |
| z-Amphiphilicity | — | + | — | — | + |
| Rothbard's pattern | 0 | 2 | 2 | 0 | 4 |
| Rarity stretches | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |

Criteria associated with the synthetic peptides derived from the nef protein were determined as follows: Hydrophobicity was evaluated by the Hopp and Woods method¹², accessibility using parameters derived from statistical determination by Janin¹², and mobility calculated using parameters obtained from the work of Ponnuswamy and Bhaskaran¹⁴. In each case, values were ranked according to the peak values. Occurrence of probable helix nucleation sites was predicted using the method of Chou and Fasman¹¹. Rothbard's patterns²⁴ were underlined in the peptide sequence while rarity stretches (not present in human and mouse self protein), defined according to Kourilsky and Claverie²⁵ were noted in bold characters. The amino acid residues are indicated by the standard single-letter code

ANTIGENIC DETERMINANTS

In order to identify antigenic determinants of the nef HIV-1_{bru} protein, different peptides were synthesized. Their physical characteristics are summarized in *Table 1*, determined according to predictive algorithms. Investigation of their antigenicity was carried out in primate (chimpanzee) and rodent (rats and mice) models^{74,75} (*Table 2*).

Two chimpanzees were immunized with the recombinant nef protein with aluminium hydroxide as adjuvant. Three of the synthetic peptides tested, namely 45–69, 79–94 and 176–206, were recognized by nef-specific IgG antibodies. In rodents (Fischer and Lou M rat strains and Balb/c mice) immunized with the nef protein in the presence of Freund's adjuvant, IgG recognizing the 45–69 and 176–206 peptides were produced. These results confirm previous observations showing that during natural HIV infection these two regions are preponderant antigenic sites^{68,70,76}. The 148–161 peptide was also antigenic in rodents when it was coupled to a carrier or synthesized as multiple antigen peptide (MAP)^{77,78}, an octameric branching lysine core with eight dendritic arms. This suggests that the MAP construction enhanced either the antigen–antibody interaction in the solid phase or favours a particular secondary structure. This observation was also reported for malaria⁷⁹ and schistosomiasis antigens⁸⁰.

The majority of antibodies produced against intact immunogenic proteins coincide with exposed surface regions (accessibility) with high segmental mobility. However, using antigenic peptides several secondary structures have been reported for peptides in solution

attention on nef antigen since some arguments suggest that nef could be an interesting model in vaccine strategy. Among the early expressed regulatory gene transcripts (nef, tat and rev), nef has been reported to be predominant^{37–39}. Balance between function of nef and rev might, moreover, underline the switch between latency and reactivity⁴⁰. However, it is clear that the HIV nef gene can be deleted without abrogating the ability of the virus to replicate *in vitro*^{41–47}. A biological effect of nef *in vivo* was reported by Kestler *et al.*⁴⁸ who observed that nef is required for maintaining high virus loads during simian immunodeficiency virus (SIV) infection and AIDS induction.

The nef gene encodes for a 27 kDa GTP-binding phosphoprotein^{49–52}, that appears to be heterogeneous during the course of cell infection⁵³. It possesses putative functional domains involved in nucleotide binding and leucine zipper domain^{54,55}. It has been reported to downregulate *in vitro* CD4-molecule expression (Ref. 52; disputed by Refs 56 and 57) and IL-2 mRNA synthesis⁵⁸, suggesting that nef is able to interfere with the expression of cellular genes. Nef protein shows partial amino acid-sequence homologies with some oncogene products such as src and ras but does not exhibit oncogenic activity⁵⁹. It also shares sequence and structural similarities with scorpion peptide toxins known to interact with K⁺ channels^{60,61}. The nef protein is mainly localized in the cytoplasm. It has also been observed on the surface of infected cells^{62–64} but requires to be myristylated for its membrane association⁶⁵.

Nef is immunogenic in some but not all HIV-infected patients. During the clinically silent phase that precedes AIDS, antibodies directed against nef have been detected in around half of the patients^{66–70}, and nef-specific cytotoxic T cells have been identified^{71–73}.

Table 2 Antigenicity

| Antigenicity | Rats | | Balb/c | Mice | | Chimpanzees | |
|---------------------------|---------|---------|--------|------|----|-------------|----|
| | Fischer | Lou M | | M | C | | |
| B-cell^a | | | | | | | |
| 45–69 | ++ | ++ | ++ | + | + | + | + |
| 79–94 | — | — | — | + | + | + | + |
| 98–112 | — | — | — | — | — | — | — |
| 148–161 | +(MAP) | ++(MAP) | +(MAP) | — | — | — | — |
| 176–206 | ++ | + | ++ | + | + | + | + |
| T-cell^b | | | | | | | |
| 45–69 | + | + | ND | + | + | + | + |
| 79–94 | — | — | — | — | — | + | + |
| 98–112 | — | — | — | + | + | + | + |
| 148–161 | — | — | — | — | — | + | + |
| 176–206 | + | + | ND | ND | ND | ND | ND |

^a B-cell antigenicity was determined by ELISA. Plates were coated with peptides (0.1 µg/well), incubated overnight and then saturated for 2 h with PBS containing 5% milk. Specific IgGs (1/100) from rats, mice and chimpanzees immunized with the nef protein were revealed by specific peroxidase-labelled sera. The absorbance was measured at 492 nm. (Immune responses were determined using peptides synthesized as multiple antigen peptides (MAP), since no response was obtained with the free peptides. The absorbances were: —, <0.2; +, <1.0; ++, >1.0.)

^b T-cell antigenicity of the synthetic peptides was determined by a proliferation assay and IL-2 production. Briefly, PBMC (chimpanzees) or lymph-node cells from animals immunized with the nef protein were incubated in the presence of peptides and antigen-presenting cells for 5 days. For the last 16–18 h, each well was pulsed with ³H-TdR. The cells were harvested onto glass fibre strips using a multiharvester and then the radioactive incorporation was counted. For IL-2 production, supernatants were kept and tested using an IL-2-dependent cell line (CTL-L)

ND, not done; +, threefold the background value (counts min⁻¹)

which folded into β -turns, β -sheet or α -helix⁸⁻¹⁰. Therefore the ability of peptide antibodies to recognize the cognate sequence in the protein lies in the propensity of peptides to adopt the appropriate conformation. The two regions (45–69 and 176–206) were predicted to exhibit a high propensity to fold in an α -helix in the protein, confirmed by the circular dichroism spectrum of the 45–69 peptide.

In parallel with the determination of B-cell antigenic sites, the nature of the T-helper cell determinants was investigated. We have found that the 45–69 and 176–206 peptides were able to induce a lymph-node T cell proliferative response in both RT-1^a (Lou M) and RT-1^y (Fischer) rats, immunized with the nef protein⁷⁴. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferative responses from the two chimpanzees immunized with the nef protein were obtained essentially when 45–69 and 98–112 peptides were used as antigens. In a previous study, Bahraoui *et al.*⁸¹ observed that PBMC from two chimpanzees proliferated *in vitro* in the presence of the C-terminal peptide of nef. The 45–69 and 176–206 peptides were also described as antigenic in Balb/c mice immunized with nef recombinant vaccine⁸².

Since the recognition of nef epitopes by T-helper cells is restricted by MHC class II molecules, it is noteworthy that antigenic T-cell determinants were closely similar in the different models studied, even though one must consider that genetically distinct rodents and a few chimpanzees may not be representative of an outbred population. This observation is reminiscent of the finding concerning the env-T1 of the HIV-1 envelope in mice, monkeys and humans⁸³⁻⁸⁵ or the malaria CSP sites in mice and humans^{86,87} and the schistosome Sm 28 GST sites in rats, mice and humans⁸⁸. In the light of results obtained in experimental models, it appears that the regions 45–69 and 176–206 contain major B- and T-cell antigenic sites.

So far the analysis of the human T-cell response to nef from HIV seropositive donors has concerned only MHC class I-restricted cytotoxic T cells^{71,72}. The antigenic sites were located in two regions of the central part of nef, corresponding to sequences 73–94 and 113–147 (and the C-terminal end of the molecule). The characterization of MHC class II-restricted T-helper cell determinants from infected patients is actually poorly documented since HIV infection is characterized by a selective loss of ability of CD4 T cells to proliferate *in vitro* to recall antigens⁸⁹⁻⁹¹.

IMMUNOGENICITY OF PEPTIDES

As previously proposed by Berzofsky⁹², immunogenicity is defined as the ability to elicit an immune response whereas antigenicity refers to the ability to be recognized by the product of a previous immune response. A series of experiments was carried out in order to define synthetic immunogens. In 1971, Mitchison⁹³, using classical hapten-carrier models, proposed that good immunogens would contain both B- and T-cell determinants. This led during the last decade to the construction of synthetic immunogens combining non-immunogenic B-cell antigenic sites with defined T-helper cell epitopes⁹⁴⁻⁹⁷. With such constructions, a total loss of the initial immunogenicity can be observed, orientation of the determinants being crucial for the induction of the immune response⁹⁸⁻¹⁰⁰. Moreover, using carrier molecules, the risk of hyperimmune reaction to the molecule or of epitopic suppression limits their use in vaccinology¹⁰¹⁻¹⁰³. Thus, new constructions have been proposed such as multiple antigen peptides^{77,78} or immunogens associating antigenic peptides and immunoadjuvants¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Nevertheless, the efficiency of such constructs still relies on an adequate selection of B- and T-cell determinants.

Rats (Lou M and Fischer strains) have been immunized with different synthetic peptides, coupled or not to a carrier or as MAP (*Table 3*). Among the peptides tested, only the 45–69 and 176–206 peptides, when not coupled, exhibited immunogenic properties. Indeed, they were able to induce both humoral and cellular responses, not only to themselves but also, more importantly, to the nef protein. Thus, the 45–69 and 176–206 peptides appear to contain both B- and T-cell epitopes.

B cells are important antigen-presenting cells (APC) and bind native antigens through their immunoglobulin-specific receptor¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. This process is extremely efficient since it lowers by 1000-fold the antigen concentration required for presentation. Processing of the Ag can be modified by binding with Ig molecules, protecting from proteolytic degradation the part of the antigen associated with the paratope and presented to T cells (positive selection) or conversely, preventing them from becoming available to the relevant T-helper cells (negative selection)¹¹⁰⁻¹¹². Thus, antigen-specific B cells and antigen-specific T cells exert a reciprocal influence resulting in the dominance of certain antigenic sites over others¹¹³, and by this physical interaction may influence antibody isotype selection¹¹⁴⁻¹¹⁵.

Using peptide subfragments, the B- and T-cell antigenic sites of the 45–69 and 176–206 peptides have been localized (*Table 4*). Antibodies from Fischer and Lou M rat strains immunized either with the nef protein or with the 45–69 and 176–206 peptides recognized the C-terminal end of each of these sequences (regions 55–69 and 192–206, respectively), and the T cells proliferated in the presence of the peptides located in the central part (regions 50–64 and 183–201). Our results together with observations made with the haemagglutinin surface glycoprotein of influenza virus, the VP1 protein of the foot-and-mouth disease virus, the glycoprotein of the herpes simplex virus, the gag protein of HIV and the Sm 28 GST of *Schistosoma mansoni*¹¹⁶⁻¹²⁰ argue in favour of positive selection since the B- and T-cell epitopes are overlapping in all these cases. Moreover, we suggest that

Table 3 Immunogenicity

| Immunogens used | Immune responses ^a | | | | |
|-----------------|-------------------------------|-----|--------------|-----|-----|
| | Lou M | | Fischer | | |
| | B | T | B | T | |
| 45–69 | +/- | +/- | 45–69 | +/- | +/- |
| 66–80* | -/- | -/- | 148–161* | -/- | ND |
| 98–112 | -/- | +/- | 148–161 BSA* | +/- | ND |
| 148–161* | -/- | -/- | 148–161 MAP* | -/- | ND |
| 176–206 | +/- | +/- | 176–206 | +/- | +/- |

ND, not done; BSA, bovine serum albumin; MAP, multiple antigen peptides

Lou M (RT-1^a) and Fischer (RT-1^y) rat strains were immunized at the base of the tail two or three (*) times with the synthetic peptides (100 µg) in Freund's adjuvant. T-cell responses were determined by lymph-node cell proliferation, while B-cell responses against the immunizing peptides and the nef protein were evaluated by ELISA (1/100)

^a Response against immunizing peptide/response against nef protein

Table 4 Epitope recognition

| | B cells | | T cells ^a | |
|-----------|---------|----------|----------------------|----------|
| | nef | 45-69Nac | nef | 45-69Nac |
| 45-69Nac | +++ | +++ | ++ | +- |
| 45-59/Nac | - | - | +/- | -/+ |
| 50-64/Nac | - | - | +/-+ | +/-+ |
| 55-69/Nac | +++ | +++ | -/- | -/- |
| 50-59/Nac | ND | ND | -/+ | -/+ |
| | nef | 176-206 | nef | 176-206 |
| 176-206 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| 176-185 | - | - | - | - |
| 181-191 | - | + | - | - |
| 184-195 | - | + | - | - |
| 183-199 | - | - | ++ | ++ |
| 188-201 | - | - | ++ | ++ |
| 192-206 | +++ | +++ | - | - |

Localization of the fine B- and T-cell antigenic sites on the 45-69 and 176-206 sequences: Rats of Lou M and Fischer strains (RT-1^a and RT-1^b) were immunized either with the nef protein or the synthetic peptides. The T-cell response was measured by a proliferation assay and the production of IL-2. Peptides from the region 45-69 were tested with and without N_α-acetylation (Nac). Positive responses were determined using 10 µg ml⁻¹ of peptides as follows: ++, >75%; +, >30%; -, <30% from the response of the immunizing antigens. Antisera were obtained after two immunizations either with the nef protein or the peptides, and tested by ELISA (1/100), absorbance was determined as: ++, >1.5; ++, >1.0; +, >0.5; -, <0.5

^aWith/without N_α-acetylation

the immunogenic nature of synthetic peptides may be related to the coexistence of B- and T-cell epitopes in the same sequence (Figure 1).

INTRINSIC AND EXTRINSIC PROPERTIES INFLUENCING ANTIGENICITY AND IMMUNOGENICITY OF SYNTHETIC PEPTIDES

Activation of class II-restricted T-helper cells requires the formation of a trimolecular complex between the antigenic peptide fragment, the class II molecule, and the T-cell receptor (TCR)¹²¹. Although the function of the MHC is relatively well understood, the molecular mechanisms of antigen processing remain unexplained. The previous model proposed that antigenic peptides interacting into the groove of MHC molecules were mainly amphipathic helical structures with residues contacting the TCR lying on the hydrophilic face of the helix while the agretopic residues were arranged on the hydrophobic face, but this led to divergent reports¹²²⁻¹²⁴. The determination of the crystallographic structure of the HLA-A2 class I molecule based on the assumption that the class II molecule will have a similar three-dimensional structure has not completely clarified this issue¹²⁵⁻¹²⁷. Indeed, the peptide-binding cleft of the MHC molecules, formed by two α -helices overlying the eight-strand β -pleated sheet structure, constitutes a groove that is just wide enough

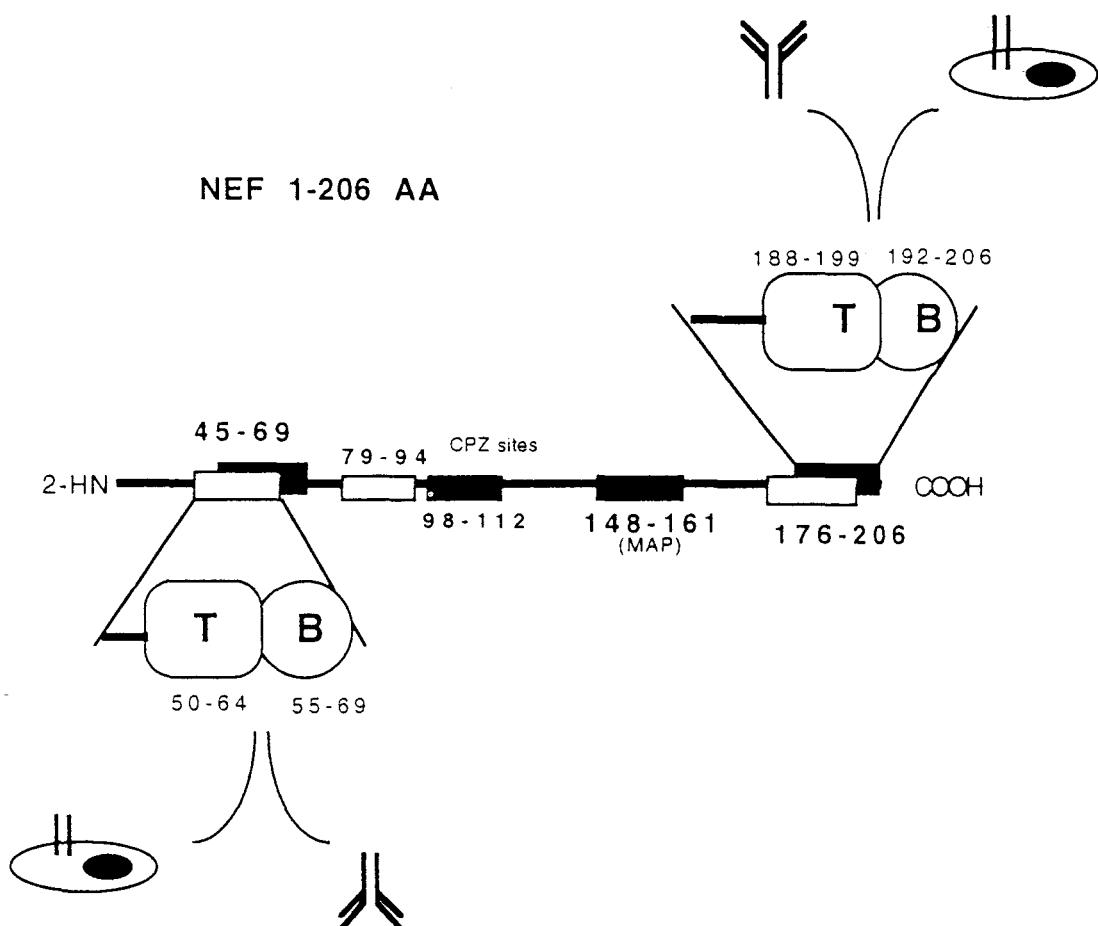


Figure 1 Summary of the T- and B-cell recognition sites of the nef protein. Defined antibody-binding and T-cell recognition determinants are represented respectively by solid and open boxes. The definition of the B- and T-cell determinants of the 45-69 and 176-206 peptides are represented by boxes (T) and circles (B). Moreover, these two peptides were able to induce a B- and T-cell response *in vivo* represented by the two pictograms. CPZ, chimpanzee; MAP, multiple antigen peptide

(1 nm) to accommodate another α -helix lying between them or an extended peptide. At the beginning of this work and on the basis of a possible helical structure, peptides were synthesized $N\alpha$ -acetylated in order to enhance their α -helical propensity. The presence of a positively charged function at the NH_2 end is known to greatly decrease the helical organization by interacting unfavourably with the helix dipole generated by hydrogen bonding along the axis of the helix¹²⁸.

Investigating the minimal active site of the 45–69 peptide, our results suggested that the T-cell determinant interacting into the groove of the MHC molecule did not necessarily adopt an α -helical structure. Indeed, even if the 45–69 $N\alpha$ -acetylated peptide adopts an α -helical structure in aqueous media (as determined by circular dichroism), its subfragment, $N\alpha$ -acetylated 50–64 peptide, which represents the T-cell antigenic and immunogenic sites, folds preferentially as a β -sheet. *In vitro*, the T-cell proliferation obtained with the 50–64 peptide, $N\alpha$ -acetylated or not, was equivalent whereas the 50–59 peptide, too short to fold in an α -helix, was antigenic for nef, for $N\alpha$ -acetylated 45–69 and for 50–64 $N\alpha$ -acetylated-specific T cells only when it was $N\alpha$ -acetylated. Thus, acetylation of a peptide, although artificial, allows a decrease in the length of the antigenic structure (ten amino acids). The plausible explanation for peptide presentation is that the T-cell determinant is an extended structure into the groove with an optimal length close to 15 amino acids. The $N\alpha$ -acetylation could stabilize the peptide MHC class II interaction and/or limit the

processing events at the *N*-terminal end^{129–131} while flanking C-terminal regions, outside the epitope, may increase binding to the class II or to the TCR molecules¹³². These results are compatible with the recent data obtained after elution and characterization of peptides into the groove of MHC class I and extended to MHC class II molecules^{26–29,133,134}. The naturally processed peptides bound to MHC class II molecules show a length of 13–17 amino acids and appear to be variously truncated from both the NH_2 and COOH termini.

Nevertheless, although not all immunodominant sites adopt secondary structures, the ability to fold as an α -helical structure may be an intrinsic feature that favours immune response. Thus, if helical structure cannot be implicated directly in the interaction with the cleft of the MHC molecule, the conformational structure may intervene by protecting peptides from excessive proteolytic degradation or by interaction with antibodies and thus serve to protect the antigenic site^{135–137}. The helix could also promote its interaction with the plasma membrane of the presenting cells^{138,139}. As the slow rate of association and the stability of the complexes once formed are important considerations^{140–142}, peptides which remain associated with the plasma membrane, present in higher local concentration, could have a better opportunity to bind to MHC.

MHC molecules are one of the most polymorphic molecules known. Polymorphic residues are clustered around the groove and this indicates how these residues influence antigen binding^{143,144}. MHC molecules select

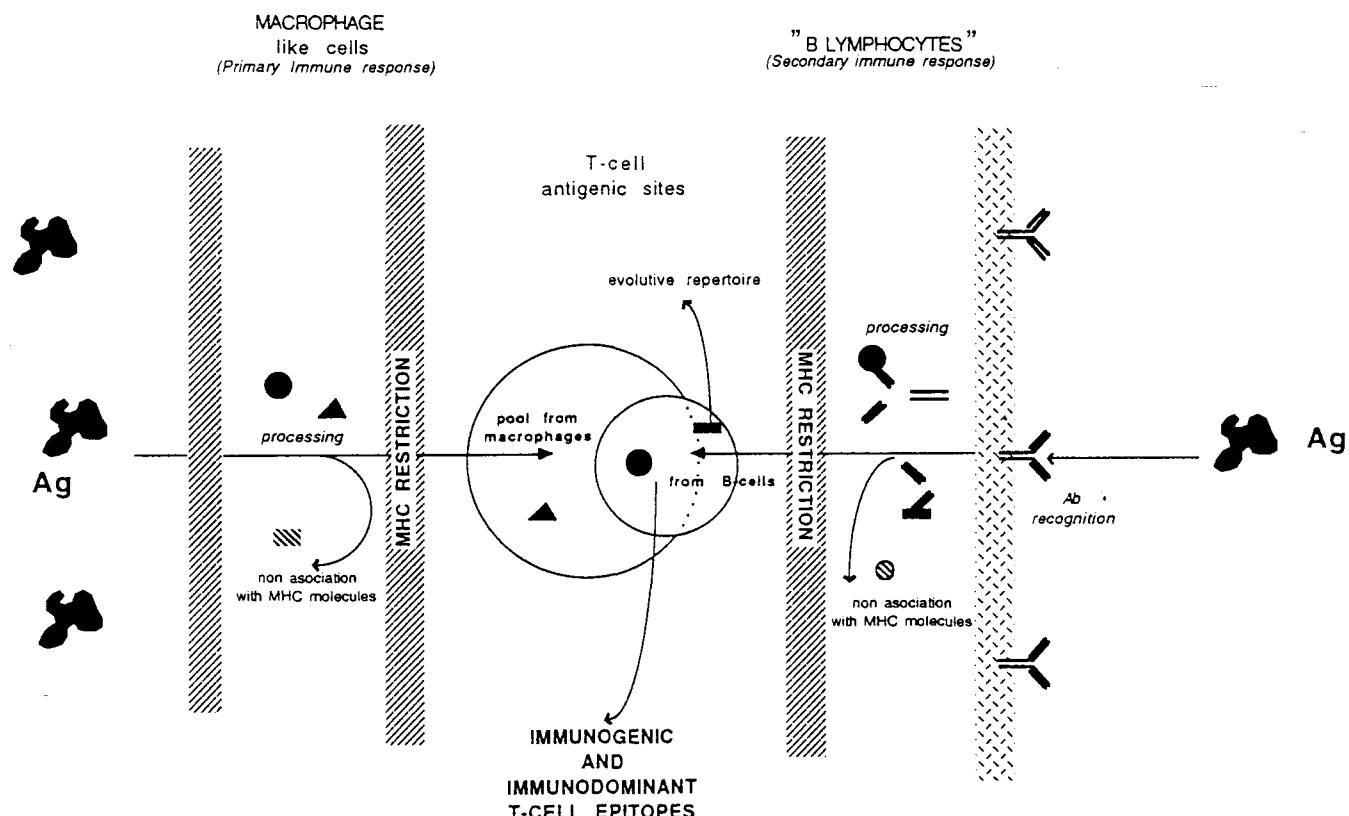


Figure 2 Scheme of antigen (Ag) presentation and implications for the immune repertoire. Initiation of immune response requires high concentrations of antigen in the presence of APCs (essentially macrophages). They pick up Ag by pinocytosis and, after processing, present peptides in association with class II MHC molecules. During secondary immune response which requires lower antigen concentrations, Ag-specific B cells or APC exhibiting Ig-Fc receptors use antibodies to bind Ag, internalize and process it. Since they are protected by paratope binding, the antigenic site presented may be the same as that presented by macrophages. Subsequently, there will be a clonal expansion of the same subset of specific T cells (immunodominant sites). Alternatively, the association of a B-cell antigenic site with antibodies, after association with the MHC molecules, may result in the generation of new specific T cells that we propose to call 'evolutive repertoire'.

peptides on the basis of the complementarity between allele-specific pockets in MHC and the side chain of the specific residues in antigenic peptides^{26,27,145}. In contrast to a previous study that observed no simple pattern in the MHC class II molecule, recent works described consensus motifs that have truncated N- and C-terminal ends^{28,29,146}. These results suggested that class II molecules are open at both ends and that they probably play an active role in antigen processing by protecting the bound peptides¹⁴⁷. The existence of such anchor residues for class II molecules was also suggested previously by the observation made by Jardetzky *et al.*¹⁴⁸ since only two amino acids in the peptide were sufficient for peptide binding. The description of anchor residues in various antigenic peptide sequences reflected the genetic restriction and constraints in MHC peptide-binding sites¹⁴⁹⁻¹⁵². These observations have major implications for a peptide vaccine strategy since the existence of such allele-specific consensus motifs imposes a restriction on peptide presentation, resulting in a reduced range of peptides presented by a given MHC molecule. The identification of such sequences, reflecting the sequence patterns of the peptide-binding sites, would be an ideal new approach for identifying major epitopes¹⁵³. However, the extensive polymorphism of MHC molecules implies a large number of different consensus motifs. Development of vaccines should therefore be directed to large molecules than exact T-cell epitopes or to using mixtures of antigenic determinants¹⁵⁴ to ensure protection for a wide range of individuals, irrespective of their MHC molecule.

Generation of effector antibodies from synthetic peptides is another challenge in vaccine strategy. Indeed, success in using peptides in a vaccine strategy depends on their capacity to adopt the conformation at the epitope location in the protein. Since they represent short structures, peptides could exist in a multiplicity of transient conformational states in dynamic equilibrium, exhibiting marked conformation in solution (aqueous, TFE solution). Thus, most antibodies raised against synthetic peptides often react well with the homologous peptide, but rarely with the protein. Yet, immunogenicity of the synthetic peptide is increased when linking peptides to a macromolecule, such as bovine serum albumin, keyhole limpet haemocyanin or tetanus toxoid. This enhancement of properties results in the induction of B-cell populations that produce antibodies recognizing the protein antigen but also exhibit effector properties (e.g. neutralizing activity)¹⁵⁵⁻¹⁵⁹. Thus, either the nature of the epitope is modified or the affinity of antibodies produced is increased. This effect may be desirable in the design of a successful subunit vaccine against virus (HIV, influenza etc.). The question of how such antibodies are induced is still unanswered.

In our model, we have observed that antibodies directed against the 45-69 and 176-206 peptides, which were immunogenic even when not coupled to a carrier, recognized different nef profiles in Western blotting assays. Indeed, nef aggregated and monomeric forms were recognized by 45-69-specific antibodies whereas antibodies directed to the 176-206 peptide recognized only the monomeric form of nef. This finding suggests that secondary structures adopted by these two peptides during immunization may be distinct. Nevertheless, we cannot exclude a possible non-accessibility of the 176-206 antigenic determinant in the aggregated form. Moreover, when the 45-69 peptide was injected coupled to the BSA

protein, the antibodies produced recognized only the aggregated but not the monomeric form. Thus, coupling peptide to carrier molecules affects recognition, limiting the range of conformations adopted by this peptide. These observations are particularly important in view of manipulation of the immune response with peptides. Thus, the use of a peptide able by itself^{160,161} or after cyclization, to mimic the initial conformation of the cognate sequence in the protein¹⁶² is an attractive approach for viral vaccine strategy since protein folding is essential for epitope formation^{163,164}.

In the context of the rational design of a synthetic peptide it is necessary to determine why particular determinants activate T-cell help while others activate T-cell suppression. Moreover, determination of a T-helper cell population secreting differential lymphokines is pertinent since lymphokines regulate the nature of Ig isotypes which serve different biological functions, and participate in the induction of effector mechanisms to particular pathogens¹⁶⁵⁻¹⁶⁸.

Using the nef HIV protein as a model, we have attempted to clarify some data concerning antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides in the light of recent works analysing antigen presentation (Figure 3). At this time of continued technological advance, the science of vaccinology, in particular as it applies to synthetic peptide vaccines, needs to be continually re-evaluated.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to C. Colson and V. Martel for typing the manuscript and S. Gianini for reviewing it. They also thank I. Wolowczuk for her ongoing scientific help and A. Dixson for his help at the Primatology Center of the CIRMF. This work was supported by ANRS, EEC (STD2 Program), the Republic of Gabon, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

REFERENCES

- 1 Steward, M. and Howard, C. Synthetic peptides a next generation of vaccines? *Immunol. Today* 1987, **8**, 51
- 2 Thornton, J., Edwards, M., Taylor, W. and Barlow, D. Location of continuous antigenic determinants in the protruding regions of proteins. *EMBO J.* 1986, **5**, 413
- 3 Novotny, J., Handschumacher, M., Haber, E., Brucolieri, R., Carlson, W., Fanning, D. *et al.* Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, **83**, 226
- 4 Tainer, J., Getzoff, E., Paterson, Y., Olson, A. and Lerner, R. The atomic mobility component of protein antigenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 1985, **3**, 501
- 5 Westhof, E., Altschuh, D., Moras, D., Bloomer, A., Mondragon, A., Klug, A. and Regenmortel, V. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* 1984, **311**, 123
- 6 Stutcliffe, G., Shinnick, T., Green, N. and Lerner, R. Antibodies that react with predetermined sites on proteins. *Science* 1983, **219**, 660
- 7 Thornton, J. and Sibanda, B. Amino and carboxy-terminal regions in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 1983, **167**, 443
- 8 Dyson, J., Rance, M., Houghten, R., Wright, P. and Lerner, R. Folding of immunogenic peptide fragments of proteins in water solution. *J. Mol. Biol.* 1988, **201**, 201
- 9 Dyson, J., Cross, K., Houghten, R., Wilson, I., Wright, P. and Lerner, R. The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn. *Nature* 1985, **318**, 480
- 10 Schulze-Gahmen, U., Prinz, H., Glatter, U. and Beyreuther, K.

- Towards assignment of secondary structures by anti-peptide antibodies. Specificity of the immune response to a β turn. *EMBO J.* 1985, **4**, 1731
- 11 Chou, Y. and Fasman, D. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 1974, **13**, 222
- 12 Hopp, T. and Woods, K. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1981, **78**, 3824–3828
- 13 Janin, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* 1979, **277**, 491–492
- 14 Ponnuswamy, P. and Bhaskaran, R. Differential equation model to study dynamic behaviour of globular proteins. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1984, **24**, 168–179
- 15 Rosenthal, A. Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response. *Immunol. Rev.* 1978, **40**, 136
- 16 Benacerraf, B. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes. *J. Immunol.* 1978, **120**, 1809
- 17 Heber-Katz, E., Hansburg, D. and Schwartz, R. The la molecule of the antigen-presenting cell plays a critical role in immune response gene regulation of T cell activation. *J. Mol. Cell. Immunol.* 1983, **1**, 3–14
- 18 Unanue, E. Antigen-presenting function of the macrophage. *Immunology* 1984, **2**, 395–428
- 19 Schwartz, R. T lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1985, **3**, 237
- 20 Ashwell, J. and Schwartz, R. T-cell recognition of antigen and the la molecule as a ternary complex. *Nature* 1986, **320**, 176–179
- 21 DeLisi, C. and Berzofsky, J. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1985, **82**, 7048–7052
- 22 Margalit, H., Spouge, J., Cornette, J., Cease, K., DeLisi, C. and Berzofsky, J. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* 1987, **138**, 2213–2229
- 23 Spouge, J., Guy, R., Cornette, J., Margalit, H., Cease, K., Berzofsky, J. and DeLisi, C. Strong conformational propensities enhance T cell antigenicity. *J. Immunol.* 1987, **138**, 204–212
- 24 Rothbard, J. and Taylor, W. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* 1988, **7**, 93–100
- 25 Kourilsky, P. and Claverie, J.M. The peptidic self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self. *Immunology* 1986, **137**, 3–21
- 26 Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H.G. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991, **351**, 290–296
- 27 Jardezyk, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A. et al. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 1991, **353**, 326–329
- 28 Hunt, D., Michel, H., Dickinson, T., Shabanowitz, J., Cox, A., Sakaguchi, K. et al. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. *Science* 1992, **256**, 1817
- 29 Chicz, R., Urban, R., Lane, W., Gorga, J., Stern, L., Vignali, D. and Strominger, J. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size. *Nature* 1992, **358**, 764
- 30 Anderer, F. Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. *Biochim. Biophys. Acta* 1963, **71**, 246
- 31 Langbeheim, H., Arnon, R. and Sela, M. Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976, **73**, 4636
- 32 Muller, G., Shapira, M. and Arnon, R. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1982, **79**, 569
- 33 Niman, H., Houghten, R., Walker, L., Reisfeld, R., Wilson, I., Hogle, J. and Lerner, R. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983, **80**, 4949
- 34 Barré-Sinoussi, F., Chermann, J., Rey, F., Nugeyre, M., Chamaret, S., Gruest, J. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1984, **220**, 868–871
- 35 Gallo, R., Salahuddin, S., Shearer, G., Kaplan, M., Haynes, B., Parker, T. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, **224**, 500–503
- 36 Levy, J., Hoffman, A., Kramer, S., Landis, J., Shimabukuro, J. and Oshiro, L. Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984, **225**, 840–842
- 37 Cullen, B. and Greene, W. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 1989, **58**, 423–426
- 38 Robert-Guroff, M., Popovic, M., Gartner, S., Markham, P., Gallo, R. and Reitz, M. Structure and expression of tat-, rev- and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* 1990, **64**, 3391
- 39 Klotman, M., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. and Wong-Staal, F. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Med. Sci.* 1991, **88**, 5011–5015
- 40 Ahmad, N., Maitra, R. and Venkatesan, S. Rev-induced modulation of nef protein underlies temporal regulation of human immunodeficiency virus replication. *Biochemistry* 1989, **86**, 6111–6115
- 41 Luciw, P., Cheng-Mayer, C. and Levy, J. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down-regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, **84**, 1434–1438
- 42 Ahmad, N. and Venkatesan, S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 1988, **241**, 1481–1485
- 43 Kim, S., Ikeuchi, K., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D. Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86**, 9544–9548
- 44 Hammes, S., Dixon, E., Malim, M., Cullen, B. and Greene, W. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86**, 9549–9553
- 45 Cheng-Mayer, C., Ianello, P., Shaw, K., Luciw, P. and Levy, J. Differential effect of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. *Science* 1989, **246**, 1629–1632
- 46 Niederman, T., Thielan, B. and Ratner, L. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Biochemistry* 1989, **86**, 1128–1132
- 47 Terwilliger, E., Sodroski, J., Rosen, D. and Haseltine, W. Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J. Virol.* 1986, **60**, 754–760
- 48 Kestler, H., Ringler, D., Mori, K., Panicali, D., Seghal, P., Daniel, M. and Desrosiers, R. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991, **65**, 651–662
- 49 Allan, J., Coligan, J., Lee, T., McLane, M., Kanki, P., Groopman, J. and Essex, M. A new HTLV-III/LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science* 1985, **230**, 810–813
- 50 Arya, S. and Gallo, R. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, **83**, 2209–2213
- 51 Franchini, G., Robert-Guroff, M., Wong-Staal, F., Ghayeb, J., Kato, L., Chang, T. and Chang, N. Expression of the protein encoded by the 3' open reading frame of human T-cell lymphotropic virus type III in bacteria: demonstration of its immunoreactivity with human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, **83**, 5282–5285
- 52 Guy, B., Kieny, M., Rivière, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M. et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 1987, **330**, 266–269
- 53 Zweig, M., Samuel, K., Showalter, S., Bladen, S., Dubois, G., Lautenberger, J. et al. Heterogeneity of Nef proteins in cells infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 1990, **179**, 504–507
- 54 Guy, B., Rivière, Y., Dott, K. and Kieny, M. Mutational analysis of the HIV nef protein. *Virology* 1990, **176**, 413–425
- 55 Samuel, K., Hodge, D., Chem, Y. and Papas, T. Nef proteins of the human immunodeficiency viruses (HIV-1 and HIV-2) and simian immunodeficiency virus (SIV) are structurally similar to leucine zipper transcriptional activation factors. *AIDS* 1991, **7**, 697–706
- 56 Backer, J., Mendola, C., Fairhurst, J. and Kovesdi, I. The HIV-1 nef protein does not have guanine nucleotide binding, GTPase, or autophosphorylating activities. *AIDS* 1991, **7**, 1015–1027
- 57 Gama Sosa, M., Degasperi, R., Kim, Y., Fazely, F., Sharma, P. and Ruprecht, R. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *AIDS* 1991, **7**, 859–860
- 58 Luria, S., Chambers, I. and Berg, P. Expression of the type 1 immunodeficiency virus nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, **88**, 5326–5330
- 59 Nebreda, A., Bryan, T., Segade, F., Wingfield, P., Venkatesan, S. and Santos, E. Biochemical and biological comparison of HIV-1 NEF and ras gene products. *Virology* 1991, **183**, 151–159
- 60 Werner, T., Ferroni, S., Saermark, T., Brack-Werner, R., Banati, R.,

- Mager, R. et al. HIV-1 Nef protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K⁺ channels. *AIDS* 1991, **5**, 1301–1308
- 61 Garry, R., Kort, J., Koch-Nolte, F. and Koch, G. Similarities of viral proteins to toxins that interact with monovalent cation channels. *Science* 1991, **5**, 1381–1384
- 62 Franchini, G., Robert-Guroff, M., Ghrayeb, J., Chang, N. and Wong-Staal, F. Cytoplasmic localization of the HTLV-III 3' orf protein in cultured T cells. *J. Virol.* 1986, **155**, 593–599
- 63 Durda, P., Leece, B., Jenosski, A., Rabin, H., Fisher, A. and Wong-Staal, F. Characterization of murine monoclonal antibodies to HIV-1 induced by synthetic peptides. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1988, **4**, 331–341
- 64 McSharry, J., Costantino, R., Robbiani, E., Echois, R., Stevens, R. and Lehman, J. Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.* 1990, **28**, 724–733
- 65 Kaminchik, J., Bashan, N., Itach, A., Sarver, N., Gorecki, M. and Panet, A. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene products translated *in vitro* and expressed in mammalian cells. *J. Virol.* 1991, **65**, 583–588
- 66 Ranki, A., Valle, S., Krohn, M., Antonen, J., Allain, J., Leuther, M. et al. Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. *Lancet* 1987, **i**, 589–593
- 67 Khalife, J., Guy, B., Capron, M., Kiely, M., Amiesen, J., Montagnier, L. et al. Isotypic restriction of the antibody response to human immunodeficiency virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1988, **4**, 3–9
- 68 Ameisen, J., Guy, B., Chamaret, S., Loche, M., Mouton, Y., Neyrinck, J. et al. Antibodies to the nef protein and to nef peptides in HIV-1 infected seronegative individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1989, **5**, 279
- 69 Reiss, P., De Ronde, A., Lange, J., De Wolf, F., Dekker, J., Debouck, C. and Goudsmit, J. Antibody response to the viral negative factor (nef) in HIV-1 infection: a correlate of levels of HIV-1 expression. *AIDS* 1989, **3**, 227
- 70 Gombert, F., Blecha, W., Tahtinen, M., Ranki, A., Pfeirer, S., Troger, W. et al. Antigenic epitopes of nef proteins from different HIV-1 strains as recognized by sera from patients with manifest and latent HIV infection. *Virology* 1990, **176**, 458
- 71 Culmann, B., Gomard, E., Kiely, M., Guy, B., Dreyfus, F., Saimot, A. et al. An antigenic peptide of the HIV-1 NEF protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules. *Eur. J. Immunol.* 1989, **19**, 2383–2386
- 72 Koenig, S., Fuerst, T., Wood, L., Woods, R., Suzich, J., Jones, G. et al. Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immunol.* 1990, **145**, 127–135
- 73 Chenciner, N., Michel, F., Dadaglio, G., Langlade-Demoyen, P., Hoffenbach, A., Leroux, A. et al. Multiple subsets of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans and in mice. *J. Immunol.* 1989, **19**, 1537–1544
- 74 Estaquier, J., Boutillon, C., Ameisen, J.-C., Gras-Masse, H., Lecocq, J.-P., Barbier, B. et al. T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (HIV-1) nef protein in rats and chimpanzees. *Mol. Immunol.* 1992, **29**, 489–499
- 75 Estaquier, J., Boutillon, C., Ameisen, J.C., Gras-Masse, H., Delanoye, A., Lecocq, J.P. et al. Determination of B cell epitopes of nef HIV-1 protein: Immunogenicity related to their structure. *Mol. Immunol.* 1992, **29**, 1337–1345
- 76 Sabatier, J., Fontan, G., Loret, E., Mabrouk, K., Rochat, H., Gluckman, J. et al. Large fragments of nef-protein and gp110 envelope glycoprotein from HIV-1. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1990, **35**, 63
- 77 Tam, J. and Zavala, F. Multiple antigen peptide. *J. Immunol. Methods* 1989, **124**, 53–61
- 78 Posnett, D., McGrath, H. and Tam, J. A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 1719–1725
- 79 Tam, J., Clavijo, P., Lu, Y., Nussenzweig, V., Nussenzweig, R. and Zavala, F. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J. Exp. Med.* 1990, **171**, 299
- 80 Marguerite, M., Bossus, M., Mazingue, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Tartar, A. et al. Analysis of antigenicity and immunogenicity of five different chemically defined constructs of a peptide. *Mol. Immunol.* 1992, **29**, 793–800
- 81 Bahraoui, E., Yagello, M., Billaud, J., Sabatier, J., Guy, B., Muchmore, E. et al. Immunogenicity of the human immunodeficiency virus (HIV) recombinant nef gene product. Mapping of T-cell and B-cell epitopes in immunized chimpanzees. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1990, **6**, 1087
- 82 Michel, F., Oftenbach, A., Froussard, P., Langlade-Demoyen, P., Kaczorek, M., Kiely, M. and Plata, F. HIV-1 Env, Nef, Gag-specific T-cell immunity in mice: conserved epitopes in Nef P27 and Gag P25 proteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1992, **8**, 469
- 83 Cease, K., Margalit, H., Cornette, J., Putney, S., Robey, W., Ouyang, C. et al. Helper T cell antigenic site identification in the acquired immunodeficiency syndrome virus gp120 envelope protein and induction of immunity in mice to the native protein using a 16-residue synthetic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, **84**, 4249–4253
- 84 Hosmalin, A., Nara, P., Zweig, M., Cease, K., Gard, E., Markham, P. et al. Enhancement of an antibody response to the envelope glycoprotein of HIV-1 in primates by priming with helper T-cell epitope peptides. In: *Vaccines 89: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* (Eds Lerner, R. et al.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989, p. 121
- 85 Berzofsky, J., Bensussan, A., Cease, K., Bourge, J., Cheynier, R., Lurhuma, Z. et al. Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* 1988, **334**, 706–708
- 86 Good, M., Maloy, W., Lunde, M., Margalit, H., Cornette, J., Smith, G. et al. Construction of synthetic immunogen: use of a new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 1987, **235**, 1059–1062
- 87 Good, M., Pombo, D., Quakyi, I., Riley, E., Houghten, R., Menon, A. et al. Human T cell recognition of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. Immunodominant T cell domains map to the polymorphic regions of the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, **85**, 1199–1203
- 88 Auriault, C., Wolowczuk, I., Gras-Masse, H., Marguerite, M., Boulanger, D., Capron, A. and Tartar, A. Epitopic characterization and vaccinal potential of peptides derived from a major antigen of *Schistosoma mansoni* (Sm28 GST). *Pept. Res.* 1991, **4**, 6–11
- 89 Lane, H., Depper, J., Greene, W., Whalen, G., Waldmann, T. and Fauci, A. Quantitative analysis of immune function in patients with AIDS: evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N. Engl. J. Med.* 1985, **313**, 79
- 90 Shearer, G., Bernstein, D., Tung, K., Via, C., Redfield, R., Salahuddin, S. and Gallo, R. A model for the selective loss of major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Immunol.* 1986, **137**, 2514
- 91 Fauci, A. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988, **239**, 617–622
- 92 Berzofsky, J. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science* 1985, **229**, 932–940
- 93 Mitchison, N.A. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. I. Measurement of the effect with transferred cells and objections to the local environment hypothesis. *Eur. J. Immunol.* 1971, **1**, 10–17
- 94 Leclerc, C., Przewlocki, G., Schutze, M. and Chedid, L. A synthetic vaccine constructed by copolymerization of B and T cell determinants. *Eur. J. Immunol.* 1987, **17**, 269
- 95 Löwenadler, B., Svensson, A.-M., Gidlund, M. et al. Enhanced immunogenicity of recombinant peptide fusions containing multiple copies of a heterologous T helper epitope. *J. Immunol.* 1990, **20**, 1541–1545
- 96 Borras-Cuesta, F., Fedon, Y. and Petit-Camurdan, A. Enhancement of peptide immunogenicity by linear polymerization. *J. Immunol.* 1988, **18**, 199–202
- 97 Tam, J.P. and Lu, Y.A. Vaccine engineering: enhancement of immunogenicity of synthetic peptide vaccines related to hepatitis in chemically defined models consisting of T and B cell epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, **86**, 9084–9088
- 98 Golvano, J., Lasarte, J., Sarobe, P., Guillen, A., Prieto, J. and Borras-Cuesta, F. Polarity of immunogens: implications for vaccine design. *Eur. J. Immunol.* 1990, **20**, 2363
- 99 Cox, J.H., Ivanyi, J., Young, D.B., Lamb, J., Syred, A. and Francis, M. Orientation of epitopes influences the immunogenicity of synthetic peptide dimers. *J. Immunol.* 1988, **18**, 2015–2019
- 100 Dyrberg, T. and Oldstone, M. Peptides as antigens. *J. Exp. Med.* 1986, **164**, 1344–1349
- 101 Herzenberg, L., Tokuhisa, T. and Herzenberg, L. Carrier-priming leads to hapten-specific suppression. *Nature* 1980, **285**, 664
- 102 Herzenberg, L. and Tokuhisa, T. Epitope-specific regulation. *J. Exp. Med.* 1982, **155**, 1730
- 103 Schutze, M., Leclerc, C., Jolivet, M., Audibert, F. and Chedid, L. Carrier-induced epitope suppression, a major issue for future synthetic vaccines. *J. Immunol.* 1985, **135**, 2319

- 104 Jung, G., Wiesmüller, K., Becker, G., Bühring, H. and Bessler, W. Increased production of specific antibodies by presentation of the antigen determinants with covalently coupled lipopeptide mitogens. *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 1985, **10**, 872–873
- 105 Wiesmüller, K., Jung, G. and Hess, G. Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator. *Vaccine* 1989, **7**, 29–33
- 106 Bernard, J., Gras-Masse, H., Drobecq, H., Tartar, A., Lefrancier, P., Hosmalin, A. et al. Synthesis of conjugates between luteinizing releasing hormone (LH-RH) and N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) models of totally synthetic vaccines. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1987, **29**, 455–463
- 107 Abbas, A., Haber, S. and Rock, L. Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. Specificities and properties of antigen-presenting B lymphocytes, and function of immunoglobulin receptors. *J. Immunol.* 1985, **135**, 1661
- 108 Lanzavecchia, A. Antigen uptake and accumulation in antigen-specific B cells. *Immunol. Rev.* 1987, **99**, 39
- 109 Pierce, S.K., Morris, J.F., Grusby, M.J., Kaumaya, P., Van Buskirk, A., Srinivasan, M. et al. Antigen-presenting function of B lymphocytes. *Immunol. Rev.* 1988, **106**, 179–180
- 110 Ozaki, S. and Berzofsky, J. Antibody conjugates mimic specific B cell presentation of antigen: relationship between T and B cell specificity. *J. Immunol.* 1987, **138**, 4133
- 111 Manca, F., Kunkl, A., Fenoglio, D., Fowler, A., Sercarz, E. and Celada, F. Constraints in T-B cooperation related to epitope topology on *E. coli* b-galactosidase I. The fine specificity of T cells dictates the fine specificity of antibodies directed to conformation-dependent determinants. *J. Immunol.* 1985, **15**, 345–350
- 112 Celada, F. and Sercarz, E. Preferential pairing of T-B specificities in the same antigen: the concept of directional help. *Vaccine* 1988, **6**, 94–98
- 113 Julius, M., Rammensee, H.-G., Ratcliffe, M., Lamers, M., Langhorne, J. and Köhler, G. The molecular interactions with helper T cells which limit antigen-specific B cell differentiation. *J. Immunol.* 1988, **18**, 381–386
- 114 Poo, W.J., Conrad, L. and Janeway, C.A. Receptor-directed focusing of lymphokine release by helper T cells. *Nature* 1988, **332**, 378–380
- 115 Kupfer, A., Mosmann, T.R. and Kupfer, H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1991, **88**, 775–779
- 116 Mils, K., Skehel, J. and Thomas, D. Extensive diversity in the recognition of influenza virus hemagglutinin by murine T helper clones. *J. Exp. Med.* 1986, **163**, 1477–1490
- 117 Francis, M., Fry, M., Rowlands, D., Bittle, J., Houghten, R., Lerner, R. and Brown, F. Immune response to uncoupled peptides of foot-and-mouth disease virus. *Immunology* 1987, **61**, 1–6
- 118 Chong, P., Sia, C., Sydor, M. and Klein, M. Identification of a potent synthetic HIV-1 immunogen compromising gag-P24 tandem T- and B-cell epitopes. *FEBS Lett.* 1990, **264**, 231
- 119 Auriault, C., Grass-Mass, H., Wolowczuk, I., Pierce, R., Balloul, J., Neyrinck, J. et al. Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* 1988, **141**, 1687
- 120 Heber-Katz, E., Valentine, S., Dietzbold, B. and Burns-Purzycki, C. Overlapping T cell antigenic sites on a synthetic peptide fragment from herpes simplex virus glycoprotein D, the degenerate MHC restriction elicited, and functional evidence for antigen-Ia interaction. *J. Exp. Med.* 1988, **167**, 275–287
- 121 Guillet, J.G., Ming-Zong, L., Briner, T., Smith, J. and Gefter, M. Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 1986, **324**, 260–262
- 122 Sette, A., Lamont, A., Buus, S., Colon, S., Miles, C. and Grey, H. Effect of conformational propensity of peptide antigens in their interaction with MHC class II molecules. *J. Immunol.* 1989, **143**, 1268–1273
- 123 Ogasawara, K., Lee Maloy, W., Beverly, B. et al. Functional analysis of the antigenic structure of a minor T cell determinant from pigeon cytochrome C. *J. Immunol.* 1989, **142**, 1448–1456
- 124 Bhayani, H., Carbone, F. and Paterson, Y. The activation of pigeon cytochrome c-specific T cell hybridomas by antigenic peptides is influenced by non-native sequences at the amino terminus of the determinant. *J. Immunol.* 1988, **141**, 377–382
- 125 Bjorkman, P., Saper, M., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J. and Wiley, D. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987, **329**, 506
- 126 Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J. and Wiley, D. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987, **329**, 506–518
- 127 Brown, J., Jardetzky, T., Saper, M., Samraoui, B., Bjorkman, P. and Wiley, D. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 1988, **332**, 845–850
- 128 Gras-Masse, H., Jolivet, M., Drobecq, H., Aubert, J., Beachey, E., Audibert, F. et al. Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Mol. Immunol.* 1988, **25**, 673
- 129 Mutch, D., Rodda, S., Benstead, M., Valerio, R. and Geysen, H. Effects of end groups on the stimulatory capacity of minimal length T cell determinant peptides. *Pept. Res.* 1991, **4**, 132–137
- 130 Wraith, D., Smilie, D., Mitchell, D., Steinman, L. and McDevitt, H. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide-mediated immunotherapy. *Cell* 1989, **59**, 247–255
- 131 Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 1986, **234**, 179–234
- 132 Brett, S., Cease, K. and Berzofsky, J. Influences of antigen processing on the expression of the T cell repertoire. *J. Exp. Med.* 1988, **168**, 357
- 133 Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991, **353**, 321–325
- 134 Yu Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A. and Janeway Jr, C. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991, **353**, 622–627
- 135 Kawamura, H. and Berzofsky, J. Enhancement of antigenic potency *in vitro* and immunogenicity *in vivo* by coupling the antigen to anti-immunoglobulin. *J. Immunol.* 1986, **136**, 58–65
- 136 Manca, F., Fenoglio, D., Kunkl, A., Cambiaggi, C., Sasso, M. and Celada, F. 1988. Differential activation of T cell clones stimulated by macrophages exposed to antigen complexed with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 1988, **140**, 2893–2898
- 137 Casten, L.A., Kaumaya, P. and Pierce, S.K. Enhanced T cell responses to antigenic peptides targeted to B cell surface Ig, Ia, or class I molecules. *J. Exp. Med.* 1988, **168**, 171–180
- 138 Kaiser, E.T. and Kézdy, F.J. Amphiphilic secondary structure: design of peptide hormones. *Science* 1984, **223**, 249–255
- 139 Carbone, F., Fox, B., Schwartz, R. and Paterson, Y. The use of hydrophobic, α -helix-defined peptides in delineating the T cell determinant for pigeon cytochrome c. *J. Immunol.* 1987, **138**, 1838–1844
- 140 Buus, S., Sette, A., Colon, S., Jenis, D. and Grey, H. Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition. *Cell* 1986, **47**, 1071–1077
- 141 Babbit, B., Allen, P., Matsueda, G., Haber, E. and Unanue, E. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *Nature* 1985, **317**, 359–361
- 142 Lanzavecchia, A., Reid, P. and Watts, C. Irreversible association of peptides with class II MHC molecules in living cells. *Nature* 1992, **357**, 249
- 143 Brown, M.A., Glimcher, L.A., Nielsen, E.A., Paul, W. and Germain, R. T cell recognition of Ia molecules selectively altered by a single aminoacid substitution. *Science* 1986, **231**, 255–258
- 144 Lee, J.M., McKean, D.J. and Watts, T.H. Functional mapping of MHC class II polymorphic residues. The α -chain controls the specificity for binding and A^d-versus an A^k-restricted peptide and the β -chain region 65–67 controls T cell recognition but not peptide binding. *J. Immunol.* 1991, **146**, 2952–2959
- 145 Buxton, S.E., Benjamin, R.J., Clayberger, C., Parham, P. and Krensky, A. Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (HLA) class I molecules: analysis of the conserved B ('45') pocket of HLA-B27. *J. Exp. Med.* 1992, **175**, 809–820
- 146 Kropshofer, H., Max, H., Müller, C., Hesse, F., Stevanovic, S., Jung, G. and Kalbacher, H. Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact motif. *J. Exp. Med.* 1992, **175**, 1799–1803
- 147 Dornermeyer, D. and Allen, P. Binding to Ia protects an immunogenic peptide from proteolytic degradation. *J. Immunol.* 1992, **142**, 1063
- 148 Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Busch, R., Rothbard, J., Strominger, J. and Wiley, D. Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *EMBO J.* 1990, **9**, 1797–1803
- 149 Allen, M.P., Matsueda, R., Evans, J. et al. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. *Nature* 1987, **327**, 713–715
- 150 Fox, B., Chen, C., Fraga, E., French, C., Singh, B. and Schwartz, R. Functionally distinct agretopic and epitopic sites. *J. Immunol.*

- 1987, **139**, 1578
- 151 Lambert, L.E. and Unanue, E.R. Analysis of the interaction of peptide hen egg white lysozyme (34–45) with the I-A^k molecule. *J. Immunol.* 1989, **143**, 802–807
- 152 Urban, J., Horvath, S. and Hood, L. Autoimmune T cells: Immune recognition of normal and variant peptide epitopes and peptide-based therapy. *Cell* 1989, **59**, 257–271
- 153 Nelson, C., Roof, R., McCourt, D. and Unanue, E. Identification of the naturally processed form of hen egg white lysozyme bound to the murine major histocompatibility complex class II molecule I-A^k. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992, **89**, 7380–7383
- 154 Estaquier, J., Boutillon, C., Gras-Masse, H., Ameisen, J.C., Deprez, B., Capron, A. et al. Cross-reactive immune response induced by a mixotope from the HIV-1 V3 loop: Study of the cellular response. *Proc. 1st PMIR*, La Grande Motte, 20–22 May 1992 (Abstract)
- 155 Cohen, G.H., Dietzschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varichio, A. et al. Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D that stimulates the production of neutralizing antibody. *J. Virol.* 1984, **49**, 102–108
- 156 Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T., Sutcliffe, G., Lerner, R. et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 1982, **298**, 30–33
- 157 Bahraoui, E.M., Granier, C., Van Rietschoten, J., Rochat, H. and El Ayeb, M. Specificity and neutralizing capacity of antibodies elicited by a synthetic peptide of scorpion toxin. *J. Immunol.* 1986, **136**, 3371–3377
- 158 Jacob, C.O., Arnon, R. and Sela, M. Effect of carrier on the immunogenic capacity of synthetic cholera vaccine. *Mol. Immunol.* 1985, **22**, 1333–1339
- 159 Weijer, W.J., Drijfhout, J.W., Geerligs, H.J., Bloemhoff, W., Feijibrief, M., Bos, C. et al. Antibodies against synthetic peptides of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D and their capability to neutralize viral infectivity *in vitro*. *J. Virol.* 1988, **62**, 501–510
- 160 Fieser, T.M., Tainer, J.A., Geysen, H.M., Houghten, R. and Lerner, R. Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein z-helix. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1987, **84**, 8568–8572
- 161 Léonetti, M., Pillet, L., Mailleire, B., Lamthanh, H., Frachon, P., Couderc, J. and Menez, A. Immunization with a peptide having both T cell and conformationally restricted B cell epitopes elicits neutralizing antisera against a snake neurotoxin. *J. Immunol.* 1990, **145**, 4214–4221
- 162 Dorow, D.S., Shi, P.T., Carbone, F.R., Minasian, E., Todd, P. and Leach, S. Two large immunogenic and antigenic myoglobin peptides and the effects of cyclisation. *Mol. Immunol.* 1985, **22**, 1255–1264
- 163 Henrickson, K.J., Kingsbury, D.W., van Wyke Coelingh, K.L., Naeve, C. and Portner, A. Neutralizing epitopes of human para-influenza virus type 3 are conformational and cannot be imitated by synthetic peptides. *Vaccine* 1991, **9**, 243–249
- 164 Steimer, K.S., Scandella, C.J., Skiles, P.V. and Haigwood, N. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120. *Science* 1991, **251**, 105–108
- 165 Jarrett, E. and Bazin, H. Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature* 1974, **251**, 613–614
- 166 Perlmutter, R., Hansburg, D., Briles, D., Nicolotti, R. and Davie, J. Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J. Immunol.* 1978, **121**, 566–572
- 167 Per Ballian, G., Slack, J., Clevinger, B., Bazin, H. and Davie, J. Subclass restriction of murine antibodies. *J. Exp. Med.* 1980, **152**, 209–218
- 168 Coutelier, J.P., van der Logt, J., Heessen, F., Warnier, G. and van Snick, J. IgG2a restriction of murine antibodies elicited by viral infection. *J. Exp. Med.* 1987, **165**, 64–69

Etude Complémentaire

Etude du répertoire T vis-à-vis des protéines du virus de l'immunodéficience humaine VIH chez des sujets infectés.

Estaquier J., Boutillon C., Gras-Masse H., Capron A., Tartar A., Auriault C. and J.C. Ameisen.

Article en préparation

Cette étude vise à définir la nature de la réponse immune vis-à-vis des protéines de régulation nef, vif, et vpr comparée à celle obtenue vis-à-vis des protéines de structures gag et env, chez des sujets asymptomatiques infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Seulement à ce stade, une réponse cellulaire de type T auxiliaire est éventuellement détectable. En effet, très tôt après l'infection la réponse aux antigènes mémoires (anatoxine téstanique, influenza ...) ainsi que celle au pokeweed mitogène (PWM), puissant activateur des cellules B et T, sont diminuées tandis que celle en réponse à la phytohémagglutinine (PHA) demeure normale.

Cette étude s'avère complémentaire de celles réalisées après immunisation expérimentale pour définir et rechercher les structures antigéniques de la protéine nef.

Des prélèvement sanguins ont été effectués sur des patients séropositifs de l'hôpital Troussseau à Tourcoing ainsi que des individus sains. Un gradient de ficoll est ensuite réalisé pour obtenir une suspension cellulaire de leucocytes (PBMC). Les antigènes fournis gracieusement par l'ANRS (Table I), et synthétisés soit par C. Boutillon dans l'unité du prof. A. Tartar soit par la société Neosystem sont utilisés pour restimuler les cellules ($5 \cdot 10^4$ cellules/duit). Après 5 jours de culture, la prolifération cellulaire est mesurée par incorporation de thymidine tritiée. Les résultats sont exprimés en index de stimulation (S.I.).

La Table II résume les résultats de 10 patients séropositifs testés vis-à-vis de l'ensemble des antigènes peptidiques et montre une grande hétérogénéité de réponse entre patients ainsi qu'entre protéines définies à l'aide des différents peptides synthétiques. Il n'est pas possible d'évaluer la réponse aux protéines recombinantes du fait de la présence de contaminants bactériens (E. Coli) toujours susceptibles d'entraîner une réponse proliférative non spécifique.

L'étude individuelle de ces différents peptides montre de manière intéressante une grande hétérogénéité dans la réponse vis-à-vis des peptides de nef tandis que majoritairement le peptide 113-129 de la protéine vif restimule les cellules de patients VIH⁺. A l'inverse, très peu des peptides dérivés des protéines de structures gag et env sont capables de restimuler les mêmes cellules. Aucune restimulation n'est observée lorsque les cellules d'individus sains sont incubées en présence des différents antigènes synthétiques.

Cette approche nous a permis d'étudier le répertoire T de patients

séropositifs et de montrer que la réponse dirigée vis-à-vis des protéines de régulation est plus fréquente que la réponse dirigée vis-à-vis des protéines de structure..

Suite aux observations qui ont montré que les cellules T de patients infectés par VIH ont une plus grande susceptibilité à mourir après restimulation, ces résultats pourraient témoigner d'une délétion préférentielle des cellules T spécifique dirigé vis-à-vis des protéines de structures.

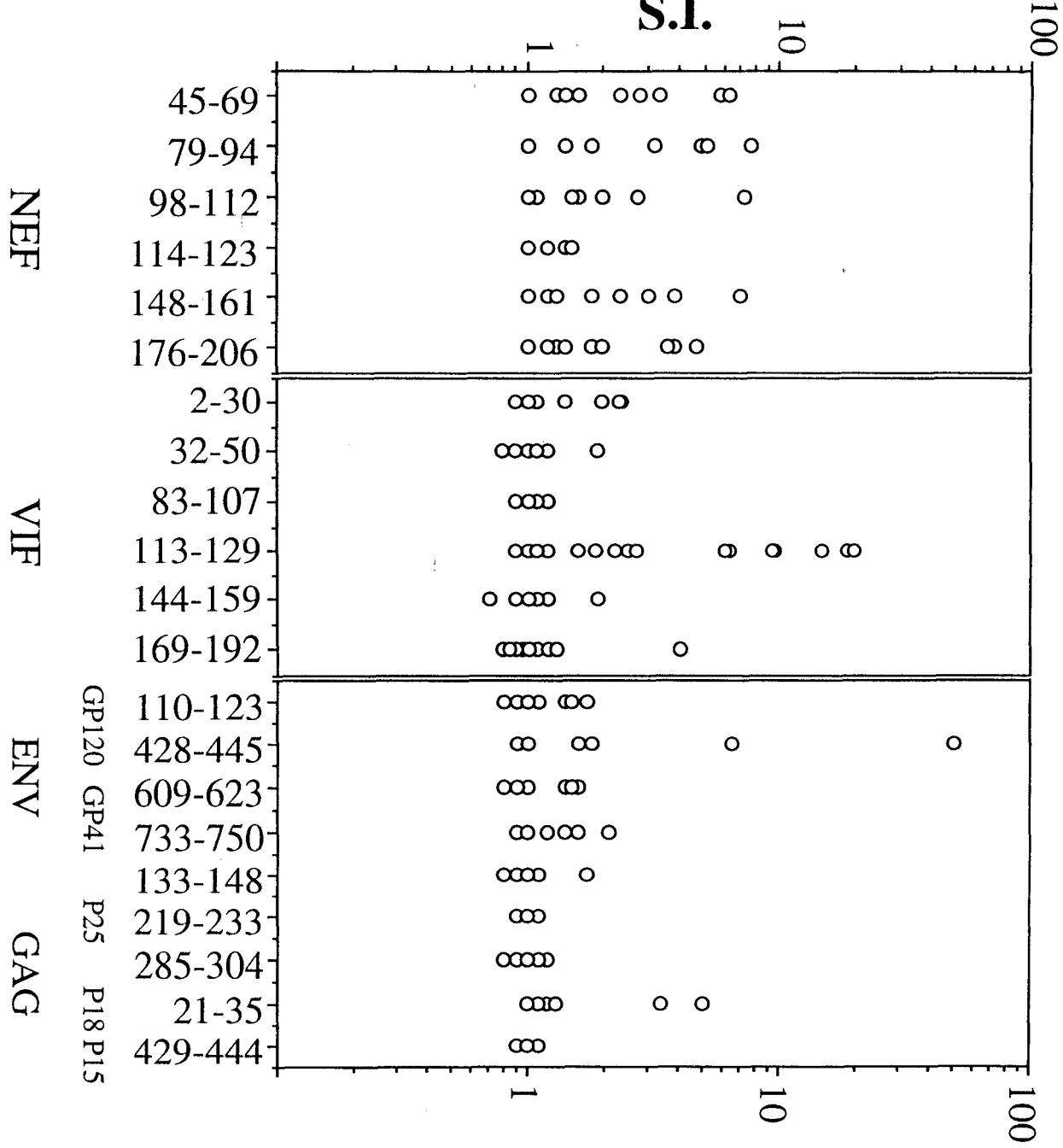
Ainsi la réponse aux antigènes de structures de structure serait-elle délétée avant celle des protéines de régulation? Il est à noter que le répertoire CD8 vis-à-vis des protéines de régulation, en particulier nef, est équivalent à celui des protéines de structure.

PROTEINES PEPTIDES**SEQUENCES**

| | | |
|--------|---------|---------------------------------|
| | 45-69 | SSNTAATNAACAWLEAQEEEEVGFP |
| | 79-94 | MTYKAAVDLSHFLKEK |
| NEF | 98-112 | EGLIHSQRRQDILDL |
| | 148-161 | VEPDKVEEANKGEN |
| | 176-196 | PEREVLEWRFDSRLAFHHVARELHPEYFKNC |
| | 2-30 | MENRWQVMIVWQVDRMRIRTWKSLVKHHMY |
| | 32-50 | SGKARGWFYRHYESPHPR |
| VIF | 83-107 | KGVSIEWRKKRYSTQVDPELADQLI |
| | 113-129 | DCFSDSAIRKALLGHIV |
| | 144-159 | SLQYLALALAALITPKKI |
| | 169-192 | LTEDRWNPQTKGHGRGSHTMNGH |
| GP 120 | 110-123 | SLWDQSLKPCVKLTPL |
| | 428-445 | FINMWQEVGKAMYAPPIS |
| GP 41 | 609-623 | CTTAVPWNASWSNKS |
| | 733-750 | DRPEGIEEEGGERDRDRS |
| P 25 | 133-148 | PIVQNIQGQMVKHQAI |
| | 219-233 | HAGPIAPGQMREPRG |
| | 285-304 | IRQGPKEPFRDYVDRFYKTL |
| P 18 | 21-35 | LRPGGKKKYKLKHIV |
| P 15 | 429-444 | RQANFLGKIWPSYKGR |

Antigènes Peptidiques

| Patients | NEF | VIF | ENV | GAG | VPR | nombre de réponses positives |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------------|
| 1 | 4/4 | 1/6 | 0/1 | 1/1 | 1/1 | 7/13 |
| 2 | 0/4 | 1/6 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/13 |
| 3 | 5/5 | 1/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 6/21 |
| 4 | 2/4 | 1/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 3/20 |
| 5 | 5/5 | 2/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 7/21 |
| 6 | 0/4 | 1/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 1/20 |
| 7 | 0/4 | 2/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 2/20 |
| 8 | 0/4 | 0/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 0/20 |
| 9 | 0/4 | 1/6 | 0/4 | 0/5 | 0/1 | 1/20 |
| 10 | 0/4 | 0/6 | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 0/13 |
| n | 4/10 | 8/10 | 0/10 | 1/10 | 1/10 | |



DISCUSSION

L'ensemble de ces travaux a permis de définir deux régions de la protéine nef, cibles à la fois des réponses B et T. Les régions reconnues comme telles au sein de ces deux peptides, 45-69 et 176-206, s'avèrent distinctes quoique recouvrantes quant à leur reconnaissance par les cellules T et les anticorps; ces deux séquences sont de plus immunogènes.

Ainsi, existe t-il une relation étroite entre immunogénicité et association des sites T et B au sein d'une même séquence? C'est ce que nous supposons être.

Récemment, les travaux de Godard *et al.* au laboratoire sur l'étude des structures antigéniques de la molécule P30 de *Toxoplasma gondii* apporte une nouvelle fois un argument supplémentaire à cette hypothèse. S'il s'avère que les caractéristiques antigéniques des sites B demeurent toujours d'actualité, les algorithmes prédictifs des sites T quant à eux sont devenus "obsoletés".

- Amphiphilicité (Berzofsky *et al.*, 1987)
- Structure hélicoïdale
- Séquences rares (Kourilsky and Claverie, 1986).

En quelques années, ces notions que j'ai présentées en introduction ont fait de grands pas.

Nos résultats suggéraient à cette époque qu'une hélice amphiphile n'était pas un caractère strict pour la définition et l'identification d'une structure reconnue par les cellules T. Ainsi; nous avons montré que:

- 1) le peptide 50-64, antigénique, adoptait une structure conformationnelle de type feuillet β plissé;
- 2) le peptide 50-59, composé de seulement dix acides aminés, est le site de reconnaissance de la cellule T, l'adjonction d'un groupement acétylé en N-terminal augmentant cette antigénicité.

Au regard des nouvelles données sur la présentation antigénique, la définition des séquences consensus définies par l'existence des sites d'ancre ou agrétopes apparaît fondamentale. Cependant du fait du nombre limité d'études réalisées chez le rat, il apparaît difficile à ce stade de définir avec précision ces séquences au sein des peptides antigéniques de la protéine nef qu'il s'agisse des molécules codées par le CMH de classe II RT-1^u ou RT-1^{v1}. Cette notion de sites d'ancre spécifiques amène à deux réflexions essentielles quant à la vaccination:

- 1) une notion de restriction, déjà bien connue concernant les molécules de CMH, mais des plus strictes quant à son mode de reconnaissance et de sélectivité

de ces sites. Ainsi, un site d'ancrage ou agrétope au niveau de la séquence peptidique est l'équivalent d'une des poches ou désétope située au site de reconnaissance de la molécule de CMH.

2) Quant aux autres acides aminés, constitutifs du peptide antigénique et exposés à la surface du complexe CMH-peptide, une certaine dégénérescence est possible, créant l'éventuelle diversité du répertoire T. D'éventuelles réactivités croisées entre peptides apparentés apparaît donc possible.

Ainsi, un vaccin devant répondre à une couverture individuelle la plus grande possible devra tenir compte de ces contingences moléculaire. Un futur vaccin ne sera t-il donc pas un mélange peptidique issu non pas d'une seule protéine mais de plusieurs?

La deuxième partie de cette thèse s'adresse en effet à ce type de questions, associant en outre la notion de variabilité de l'agent infectieux.

ARTICLE 4

The mixotope: a combinatorial peptide library as a T-cell and B-cell Immunogen.

Estaquier J., Gras-Masse H., Boutillon C., Ameisen J.C., Capron A., Tartar A., and C. Auriault.

European Journal of Immunology, 1994, 24: 2789-2795.

Le développement de vaccin basé sur l'utilisation individuelle de protéines ou de peptides est confronté et se heurte au fort degré de variabilité des agents infectieux lorsqu'il s'agit en particulier de pathogènes viraux; variabilité qui peut être lié à la forte pression de sélection qu'exerce le système immunitaire vis-à-vis de cet agent. Un de ces épitopes hautement variable, dénommés V3 est situé sur la protéine gp120 du virus de l'immunodéficience humaine VIH et est impliqué dans la neutralisation virale. En outre, ce site apparaît majeur dans le tropisme cellulaire du virus VIH.

A l'initiative du groupe du professeur A. Tartar, un modèle nouveau a été conçu, dénommé Mixotope. Il s'agit d'un mélange peptidique obtenu en une synthèse combinatoire et a permis de générer en une seule synthèse 750 000 séquences apparentées. L'un des objectifs était, par le nombre de combinaisons possibles, de générer un répertoire B neutralisant capable d'inhiber le plus grand nombre de souches virales ainsi que de contrecarrer l'émergence de nouveaux variants chez un même individu.

Notre approche pour notre part a visé à étudier l'immunogénicité d'une telle préparation dans des modèles murins (rats et souris) et de définir les répertoires B et T induit.

Les tests utilisés sont:

1) pour la partie cellulaire B, un test ELISA utilisant soit différents peptides V3 d'isolats distincts, soit la protéine recombinante gp160 pour la détection des anticorps spécifiques;

2) pour la partie cellulaire T, un test de prolifération cellulaire T en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules activées, ainsi qu'un dosage biologique pour la détermination de la sécrétion d'interleukines 2 et 3 utilisant respectivement les lignés CTLL-2 et 32 DCL.

Nos résultats montrent:

1) Le mixotope, 750 000 séquences apparentées, est immunogène et capable d'induire une réponse B et T.

2) Cette réponse est non restreinte génétiquement, plus de 30 haplotypes testés à ce jour, font une réponse dirigée vis-à-vis de ce mélange.

3) Le profil de sécrétion des cytokines témoigne de la présence de sous-populations TH1 et TH2, quoique la présence d'interleukine 4 ne soit pas détectée dans nos surnageants de culture.

4) Les différences entre peptides apparentés sont susceptibles quant à l'activation cellulaire T, d'induire une sécrétion d'IL-3 en l'absence de prolifération et de sécrétion d'interleukine 2.

Ainsi, un mélange aussi complexe, s'avère être immunogène et ce chez un grand nombre d'animaux immunisés. Ces observations suggèrent que les différents haplotypes, restriction du site de fixation des molécules de CMH,

trouvent au sein de ce mélange une ou plusieurs séquences qui seront ultérieurement présentées aux cellules T. Il faut toutefois noter que la sélection des dits peptides, susceptible de restimuler *in vitro* ces cellules, n'apparaît pas aussi restreinte que le test de prolifération le laisse suggérer.

En effet, le dosage de l'IL-3, autre marqueur de l'activation cellulaire T, suggère l'existence soit:

1) de sous-populations T helper distinctes TH1-TH2 puisque la sécrétion d'IL-3 ne permet pas d'en faire la distinction.

2) qu'une même cellule T restimulée par des ligands apparentés conduit à une transduction des signaux intra-cellulaires différente, se traduisant en terme de cytokines à des profils de sécrétions distinctes.

Cette dernière hypothèse trouvant un support possible dans les travaux relafifs aux peptides agonistes et antagonistes capable d'induire ou non une réponse des cellules T, voire d'entraîner leur mort.

J. Estaquier^{•*},
H. Gras-Masse[□],
C. Boutillon[□],
J. C. Ameisen[•],
A. Capron[•],
A. Tartar[□] and
C. Auriault^{•*}

Centre d'Immunologie des maladies
transmissibles et allergiques, Unité
mixte INSERM U167-CNRS 624[•]
and Laboratoire de Chimie des
Biomolécules, URA-CNRS 1309[□],
Institut Pasteur, Lille, France.

The mixotope: a combinatorial peptide library as a T cell and B cell immunogen

We report a new approach in peptide vaccine strategy based on combinatorial synthesis. A library of 7.5×10^5 related peptides, termed mixotope, was derived from the sequence of the third hypervariable domain (V3 loop) of the human immunodeficiency virus (HIV) envelope protein.

This preparation induced a strong immune response in all syngeneic and outbred rodents tested. The response directed against the mixotope included antibodies, CD4⁺ T helper cells (TH1 and TH2) and CD8⁺ T cells. In rodents immunized with the mixotope, the T cell response directed against individual V3 peptide sequences (BRU, MN, RF, SF2, and ELI) as measured by T cell proliferation and IL-2 production, was found to be major histocompatibility complex haplotype-dependent. However, additional experiments performed in mice indicated that selectivity was less restrictive when using IL-3 secretion to explore T cell activation.

This combinatorial antigen could be considered as a series of agretopic motifs framing a multiplicity of closely related epitopes for T cell recognition and able to elicit a T cell and B cell repertoire. This new construct may therefore provide a basis for the design of future vaccine strategies.

1 Introduction

Antigens are presented to T lymphocytes in the form of peptides associated with either class I or class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC) [1-5]. One of the major problems in designing synthetic peptide vaccines is that peptide antigens usually associate with only one or a few variants of the highly polymorphic MHC antigens. Promiscuous peptides, that associate with different MHC molecules are rare and, in such instances, promiscuity is limited to few MHC alleles [6, 7]. The recent structural analysis of MHC molecules and peptide elution studies [8-15] suggest the presence within a given antigen of allele-specific motifs composed of a pair of amino acids referred to as anchor residues, separated by a variable anchor spacer sequence which rests in the pocket of the MHC groove [16-19]. This model of recognition provides the immune system with a probability of 1/100 for efficient presentation of one peptide per average-sized protein.

Immunodominant domains from infectious pathogens often map to protein regions which vary in response to immune pressure [20-22]. The V3 loop of the HIV gp160

envelope protein, a target for neutralizing antibodies, provides a spectacular example of such variability representing an obstacle for vaccine development. With regards to such antigenic drift, we present a new peptide vaccine model based on a peptide library of closely related peptides.

Using a unique combinatorial synthesis, surrounding a conserved tetrapeptide (GPGR; 22 to 25 residues long) of the V3 sequence of the HIV env protein, a library of 7.5×10^5 related env-sequences, called mixotope antigen (MA), was generated. In each position, surrounding this GPGR, amino acid residues were selected from 138 HIV-1 isolates on the basis of their frequency of occurrence in the known V3 sequences [23, 24]. This mixture of different, but closely related peptides, may offer a blurred image of any V3 sequence present in the existing isolates and the possible mutants of HIV. Since the agretope and the epitope appear to function independently, the mixotope should be seen by the MHC not as a set of 7.5×10^5 different peptides, but as a mix of only 58 different agretopic pairs, using for example a relative spacing of i, i + 8. These pairs frame a multiplicity of combinatorial peptide sequences for T cell recognition (epitopes) which define 2 to 864 possible sequences between positions i + 1 to i + 7 (Table 1).

In the present study, we examined the ability of the V3 mixotope antigen to bypass MHC restriction and analyzed the nature of the immune response elicited.

[I 12774]

* This work was supported by the CNRS, the INSERM and the ANRS.

Correspondance: J. Estaquier, INSERM U415, Institut Pasteur, BP 245, F-59019 Lille, France

Abbreviations: MA: Mixotope antigen

Key words: Human immunodeficiency virus / Peptide library / Immunogenicity / Cytokines

2 Materials and methods

2.1 Medium and reagents

For all cultures, RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France), containing 20 mM Hepes (Sigma, St. Louis, MO), 100 U penicillin/ml, 100 µg streptomycin/ml (Specia, Paris,

Table 1. Composition of the mixotope antigen^a

| composition | N | N | T | R | K | S | I | H | I | - | G | P | G | R | A | F | Y | T | T | G | K | I | I | G (C) | | |
|-----------------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|---|---|---|---|-------|---|--|
| | K | R | G | T | M | Q | R | | | | V | I | V | A | R | E | Q | - | | | | | | | | |
| | R | R | R | R | P | Y | S | | | | V | H | L | I | K | | | | | | | | | | | |
| degeneracy | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 6 | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | |
| combinatory pairs in relative positions i,i+8 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 12 | 12 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | |
| combinatory sequences from i+1 to i+7 | 72 | 216 | 432 | 432 | 216 | 72 | 72 | 12 | 8 | 16 | 24 | 48 | 144 | 432 | 864 | 864 | 216 | 72 | | | | | | | | |

a) Single letter amino acid codes are used. Gaps in the sequence alignment are represented by the symbol “-”. The conditions used for the synthesis allowed the incorporation of an equivalent fraction of each amino acid represented in degenerate positions (e.g. 1/3 for each amino acid in position where three possibilities were considered). We could thus consider each amino acid in a degenerate position as statistically equivalent, and calculate the number of combinations of possible “agretopic motifs” in a definite spacing, for example in relative positions i, i + 8, and the number of combinatory sequences framed by these agretopic anchor pairs in position i + to i + 7.

France) and 10 % heat-inactivated FCS (Gibco) was supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M β -mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). The monoclonal antibodies used in this study were: OX12 (anti-rat Ig κ light chain), OX8 (anti-rat CD8) and W3/25 (anti-rat CD4) purchased from Seralab. Vaccinia recombinant purified gp160 HIV-1 LAVbru protein was provided by Transgene, Strasbourg, France.

2.2 Animals

Fischer (RT-1^{iv1}), and Lou M (RT-1^u) female syngeneic rat strains and outbred females OFA rats were maintained in the animal unit of the Institut Pasteur or purchased from Iffa Credo, Lyon, France. BALB/c, C57b1/6 and CBA female mice were obtained from Iffa Credo.

2.3 Peptide synthesis

Detailed synthesis was described previously [25]. Briefly, the mixotope antigen was synthesized by using conventional solid-phase “boc-benzyl” strategy. The most probable amino acid residues in each degenerate position of the central region of the V3 loop from 138 randomly selected isolates of HIV-1 were coupled using the dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole method. In each degenerate position, all amino acids having a percent occurrence higher than 7 % were arbitrarily selected. An additional cystein residue was introduced in the C-terminal position, to allow coupling to carrier protein in the course of another study. After HF cleavage and deprotection (in low and high concentrations of HF, respectively), crude peptide was purified by three consecutive TFA/diethylether precipitation steps. The mixotope antigen was identified by amino acid analysis after total acid hydrolysis, the only possible analytical control of the final product. In each of these positions, the different amino acids or the gap were represented in an equivalent fraction generating thus 7.5×10^5 distinct sequences. Other analyses were also performed, including microsequencing, which did not provide additional information, and plasma desorption mass spectrometry, which confirmed that the mixotope antigen is

a random peptide mixture. The individual V3 sequences used to analyse the immune repertoire generated by the mixotope were the RF, BRU, MN, SF2, and ELI peptides as follows: **BRU:** **TRPNNNTRKSIRIQRGPGRFVTIG-KIGNMRQAHC**, **MN:** **TRPNYNKRKRIHIGPGRAY-TTKNIIGTIRQAHC**, **SF2:** **TRPNNNTRKSIYIGPGRAY-FHTTGRIIGDIRKAHC**, **RF:** **TRPNNNTRKSITKGPG-RVIYATGQIIQDIQKAHC**, **ELI:** **ARPYQNTRQRTPI-GLGQSLYTTTRSRSHIGQAHC**; residues in bold characters were not present in the mixotope antigen (MA).

2.4 Immunization procedure

Rodents were immunized at the base of the tail either with 100 μ g or 50 μ g of peptide for rats and mice, respectively, in complete Freund's adjuvant (CFA; Difco, Detroit, MI). Twenty days later, animals were boosted the same way with half the antigen quantity emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA).

2.5 Proliferation assay

Five days after the last immunization, the draining lymph nodes and the spleen were removed. Lymph node T cells from rats were purified by passage through a nylon wool column. A total of 5×10^5 T cells were cultured with antigen and 5×10^5 syngeneic irradiated antigen-presenting cells (30 Grey, Philips RT) from rat thymus in a total volume of 0.2 ml in flat-bottom 96-well plates (Falcon, Becton Dickinson, France) in a humidified CO₂ incubator at 37°C.

Five days later, each well was pulsed with 18.5 KBq of [³H]dThd (CEA, Gif-sur-Yvette, France) to measure T cell proliferation; 12 to 16 h later the wells were harvested onto glass fiber filter strips, using a multiharvester (Skatron, Liergen, Norway) and the radioactivity, incorporated into DNA was determined by liquid scintillation counting (LKB, Wallac, Turku, Finland). CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated as follows. Briefly, lymph node cells were separated into nonadherent and adherent cells by panning (1 h at 37°C) and B cells were removed, using OX12-coated

petri dishes. Then, the nonadherent fractions were incubated on ice 30 min with the anti-CD4 or anti-CD8 monoclonal antibody. Depletion of T cell subsets was performed by negative selection using magnetic beads coated with goat anti-mouse IgG (30 min on ice) and separated using a magnetic-particle concentrator. Cytofluorimetry analysis was performed to verify purity, which was greater than 85 %.

2.6 Lymphokine assays

Supernatants from spleen or lymph node cells of rodents immunized with the mixotope antigen were used to analyze lymphokine production. IL-2 production was tested using an IL-2-dependent T cell line (CTL-L, ATCC). CTL-L (10^4 cells) were added to the appropriate antigen supernatants and incubated during 24 h including a 10-h pulse with [^3H] dThd (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) before harvesting. Units of IL-2 were determined by comparison with standard curves using recombinant IL-2 (Genzyme). IL-3 production was measured using an IL-3-dependent T cell line (32D CL, ATCC). 32D CL (10^4 cells) were added to the supernatants and incubated during 48 h. IFN- γ was measured using the B cell lymphoma-sensitive cell line, WEHI-279 (ATCC). Cell proliferation (using 10^4 cells) was determined by 18 h of [^3H] dThd incorporation after 3 days of culture. IL-4 and IL-5 production was determined by ELISA. Briefly, samples were analyzed with pairs of rat anti-IL-5 and anti-IL-4 mAb in a two-site sandwich ELISA. Microtiter plate wells were coated first with monoclonal antibody (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 4°C overnight. Plates were then washed (PBS, Tween 1%) and blocked by the addition of 1% BSA in PBS. Samples and standard dilutions (rIL-4 and rIL-5 lymphokines) were added and incubated for 2 h. Plates were washed and the antibody-biotin conjugate (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added for 1 h at room temperature. Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate was incubated for 1 h, washed extensively and revealed with substrate (orthophenylenediamine, Sigma), in phosphate buffer solution 0.1 M, pH 5.5 containing H₂O₂. The optical density was measured through a multi-channel spectrophotometer at 492 nm.

2.7 Peptide ELISA

Microtiter plate wells (Nunc, Denmark) were coated for 24 h at 4°C with 0.5 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ of synthetic V3 peptides or vaccinia-recombinant purified gp160 HIV-1 LAVbru. The plates were saturated before addition of the appropriate dilutions of serum. IgG was detected by a rabbit anti-rat peroxidase (ICN Biomedicals, Lisle, IL) and revealed with substrate as described above.

3 Results and discussion

3.1 Immunogenicity of the mixotope antigen

3.1.1 T cell response in syngeneic rats

Two syngeneic rat strains, Lou M (RT-1^u) and Fischer (RT-1^{iv}), as well as outbred rat populations were immunized with the MA. The specificity of the immune repertoire generated by MA was analyzed using either MA itself

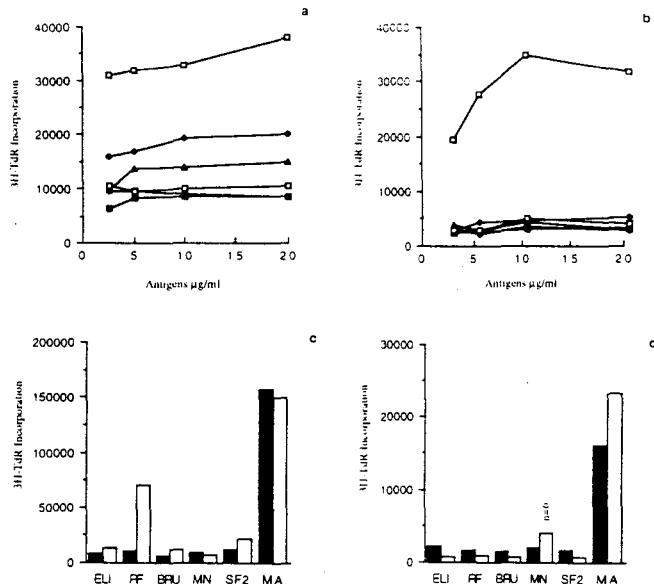


Figure 1. T cell responses elicited by the mixotope antigen (MA) in Lou M (RT-1^u) and Fischer (RT-1^{iv}) rat strains. Rats were immunized twice at the base of the tail with MA in Freund's adjuvant. Draining lymph nodes from 3 rats in each experiment were removed 5 days after the last immunization, and the T cells were purified. Depletion of the T cell subsets using anti-CD4 (W3/25) and anti-CD8 (OX8) mAb were performed by negative selection. A total of 5×10^5 unfractionated T cells (a: Lou M; b: Fischer) or T cell subsets (c: CD4⁺; d: CD8⁺; Lou M □; Fischer ■) were incubated with 5×10^5 syngeneic thymic irradiated APC (30 Grey, Philips RT) in a dose response of the different peptides (MA: □; RF: ●; SF2: ○; MN: ▲; BRU: ■; ELI: △) for 5 days. For T cell subsets, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of peptides were used for restimulation. Proliferation was measured by [^3H] thymidine incorporation and the cells were harvested after 16 h using a multiharvester (Skatron, Lierbyen, Norway). The experiments were performed in triplicate (SE < 10 %) and repeated at least three times (n represents stimulation index and p was < 0.05, using Student's t test).

as an antigen, or a set of individual V3 peptides including BRU, the less divergent peptide whose core sequence was contained in one of the 750 000 combinatory sequences of the mixotope; RF, MN, SF2, and ELI possess some amino acids not represented in the degenerated positions of the MA. ELI was the most divergent sequence, and could be considered as the least specific peptide (negative control). T cell responses were determined using purified draining lymph node cells, and tested either in a standard T cell proliferation assay, or using IL-2 secretion. Fig. 1a and b shows that MA restimulated specific T lymphocytes in both rat syngeneic strains previously immunized with MA, whereas no restimulation was observed with T lymphocytes from rodents previously immunized with Freund's adjuvant alone (data not shown). Among the individual V3 peptides, the RF peptide and, to a lesser extent, the MN peptide induced a T cell recall proliferation in Lou M rats, whereas none of the five peptides tested restimulated Fischer rat T cells. The IL-2 secretion, measured in parallel with the T cell proliferation assay, did not reveal any other peptide response (Table 2).

In additional experiments, Lou M rats were immunized with the RF individual peptide (Fig. 2a) or with the BRU individual peptide (Fig. 2b). Interestingly, MA restimu-

Table 2. Evaluation of the MHC restriction of the mixotope preparation in different haplotypes of rodents^a

| MA | RF | IL-2 ACTIVITY | | | | Media |
|----------------------|-------------|---------------|------------|------------|-----|------------------------|
| | | SF2 | MN | BRU | ELI | |
| OFA | | | | | | |
| 18 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 12.9 | < 1 | 1.5 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 23 | < 1 | 5.6 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| > 60 | 1.4 | 3.6 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 35 | 4.1 | 11 | 3.4 | 1.8 | 1.9 | 2.0 |
| 29 | 4.5 | 1.2 | 1.0 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 21 | 3.5 | 4.8 | 4.5 | 2.8 | 2.5 | 2.1 |
| 19 | 1.8 | 9.6 | 2.0 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 26 | 6.4 | 5.6 | 2.8 | 1.5 | 2.0 | 1.4 |
| 40 | 7.8 | 3.4 | 5.2 | 1.6 | 1.0 | 1.5 |
| 24.5 | 5.1 | 1.0 | 2.1 | 1.0 | < 1 | < 1 |
| > 60 | 14.7 | < 1 | 2.1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| > 60 | 11.5 | < 1 | 2.8 | 1.5 | < 1 | < 1 |
| 28.4 | 1.6 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| > 60 | 4.5 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 100 % | 80 % | 60 % | 53 % | 8 % | 0 % | Percentage of response |
| Lou M Fischer | | | | | | |
| 30 | 2.3 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |
| 20 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |

a) The Lou M (RT-1^u) and Fischer (RT-1^{w1}) syngeneic rat strains, and an outbred rat population (15 OFA rats) were immunized with MA. After 36 h of incubation in the presence of the synthetic peptides (20 µg/ml), T cell supernatants were assayed for IL-2 activity. The minimum sensitivity of the IL-2 assay was 0.2 UI but here we considered as positive the production of > 1 UI; Significant IL-2 production is noted in bold characters in comparison to the media alone.

The nature of class I *versus* class II molecule restriction of antigen-peptide recognition divides T cells into functionally distinct populations, corresponding, respectively, to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. To determine the relative contribution of the MHC molecules in the generation of each of these T cell subsets, CD8⁺ and CD4⁺ T cells from rat lymph nodes were isolated. Both purified CD8⁺ and CD4⁺ T cells from Lou M and Fischer rats (Fig. 1c and d) proliferated in response to MA. IL-2 was produced by the CD4⁺ populations and to a lesser extent by the CD8⁺ Lou M CD4⁺: 27 UI and CD8⁺: 1.4 UI; Fischer CD4⁺: 26 UI and CD8⁺: 0.5 UI). The RF and the MN peptides, which both induced T cell proliferation from unfractionated Lou M T cells restimulated the CD4⁺ and the CD8⁺ populations, respectively. These results indicate that MA generates not only specific CD4⁺ T cells *in vivo* but also CD8⁺ T cells. They also suggest that selection of immunogenic peptides among the V3 individual peptides is dependent on the class of the MHC molecules.

3.1.2 T cell response in outbred rats

To further evaluate the MHC restriction of the immune response against MA, a panel of outbred rats with distinct haplotypes was tested (Table 2). Lymphocytes from all the rodents tested produced IL-2 in response to restimulation by MA, suggesting that it contains agretopic motifs for all the MHC tested. The selectivity of the response to the individual V3 peptide previously observed in syngeneic rat strains was also found in the outbred strains since their ability to restimulate specific T cells differed among the individual animals. Interestingly, the RF peptide was the major antigenic peptide in this outbred rat population (OFA), although the RF sequence was only partially present in the mixotope. Thus, selected subsets of peptides could restimulate a cluster of T cells related to a family of V3-analog peptide, which is in accordance with the heteroclitism of the T cell recognition process.

3.1.3 B cell response

We then explored the antigen specificity of the antibody response. Fig. 3 shows the humoral response of both Lou M and Fischer rat strains. The immunizing Ag (MA) elicited specific antibodies directed to itself which also recognized the recombinant gp160 HIV envelope protein in both Lou M and Fischer rats (Fig. 3c). Antibodies also recognized the individual BRU and RF peptides, in Lou M and Fischer rat strains, respectively (Fig. 3a, b). This suggested that the selectivity of the antibody response was also related to the MHC haplotype restriction. Yet in the same haplotype, the B and T cells recognized different antigenic peptides, suggesting the occurrence of independent *in vivo* selections of B and T cells.

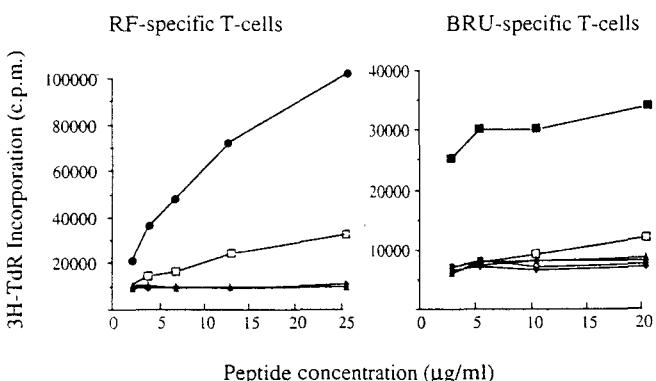


Figure 2. T cell responses elicited by the RF and the BRU individual peptide on Lou M rats. T cell proliferation and immunization were carried out as in Fig. 1. Cells were restimulated with the individual peptides or the mixotope (MA: □; RF: ●; SF2: ○; MN: ▲; BRU: ■; ELI: △). The experiments were performed in triplicate (SE < 10 %) and repeated at least twice.

lated *in vitro* RF-specific T cells, but not BRU-specific T cells. Together with our finding that T cells from MA-immunized Lou M rats were restimulated *in vitro* by RF, and not by BRU peptide, these data support the hypothesis that T cells respond to a cluster of V3 sequences, and that the RF sequence represents a dominant cluster in the Lou M rat.

3.2 Cytokine production

3.2.1 Cytokine profile from mice immunized with the mixotope antigen

CD4⁺ T helper cells include distinct functional populations, with different patterns of cytokine expression [25].

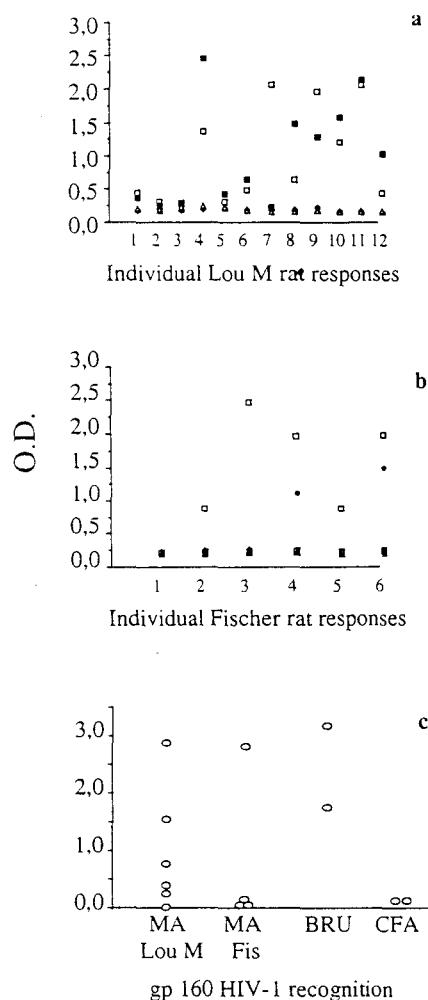


Figure 3. B cell responses from syngeneic Lou M and Fischer rats immunized with the mixotope antigen (MA). Antibody responses were evaluated by ELISA using microtiter plate wells coated with the different peptides (MA: □; RF: ●; SF2: ○; MN: ▲; BRU: ■; ELI: △) or the recombinant gp160 protein (c). Sera from individual rats (a: Lou M; b: Fischer) were used at 1/50 dilution and optical density was determined at 492 nm. In addition, Lou M rats immunized with the BRU peptide or with adjuvants alone (CFA), were used as control.

TH1 cells produce IL-2, IFN γ and lymphotxin, whereas TH2 cells produce IL-4 and IL-5; IL-3 is apparently produced by both cell subsets. Due to a lack of adequate reagents, cytokine analysis is restricted in the rat model. We therefore investigated the cytokine patterns of spleen cells from mice with distinct MHC haplotypes ($H-2^b$, $H-2^d$, $H-2^k$) after immunization with the mixotope antigen. A time course of cytokine secretions was carried out (18, 36 and 60 h after T cell stimulation) and secretion was maximal at 36 h. In all the haplotypes tested T cells proliferated in response to MA, and high amounts of IL-2, IFN γ , IL-3 and IL-5 were detected in the supernatants of MA-stimulated T cells. Very little or no IL-4 were detectable under our experimental conditions (Table 3). Since IL-5 was produced in addition to the TH1-specific lymphokines, the mixotope antigen appeared to elicit both TH1 and TH2 cell subsets.

Table 3. Analysis of the lymphokine patterns produced by total spleen cells from mice (BALB/c $H-2^d$, C57BL/6 $H-2^b$, and (CBA $H-2^k$) immunized with the mixotope antigen

| | IL-2 | IFN γ | Lymphokine profiles | | | | $[^3H]dThd^c$ (cpm) |
|----------------|------|--------------|---------------------|------|------|-------|------------------------|
| | | | IL-3 ^b | IL-4 | IL-5 | | |
| CBA | | | | | | | |
| — | < 1 | 8 | 0.8 | < 3 | 5.5 | 3500 | |
| MA | 55 | 64 | 15 | < 3 | 42 | 45750 | |
| Con A | > 60 | > 200 | 21 | 18 | 66 | ND | |
| C57BL/6 | | | | | | | |
| — | < 1 | 2 | 0.6 | < 3 | 5.5 | 4750 | |
| MA | > 60 | 200 | 18 | 3.5 | 110 | 62500 | |
| Con A | > 60 | > 200 | 21 | 6 | 70 | ND | |
| BALB/c | | | | | | | |
| — | < 1 | | 0.2 | < 3 | 5 | 6700 | |
| MA | 50 | ND | 22 | < 3 | 71 | 51200 | |
| Con A | > 60 | | 19 | 14 | 100 | ND | |

- a) The induction of lymphokine release from 10^6 spleen cells in the presence of the MA (20 μ g/ml) or Con A (5 μ g/ml) was measured during the course of T cell activation (18, 36 and 60 h, only 36 h is shown). Lymphokines from supernatants were determined as described in Sect. □. The sensitivity of each assay was, respectively < 0.2 UI for IL-2, < 2 UI for IFN γ , < 3 for IL-4 and IL-5.
- b) IL-3 secretion was measured by the proliferation of the 32 DCL and values represent cpm $\times 10^{-3}$.
- c) $[^3H]dThd$ represent the proliferation of 4×10^5 spleen cells at 5 days of culture. Data represent results from one out of three similar experiments.

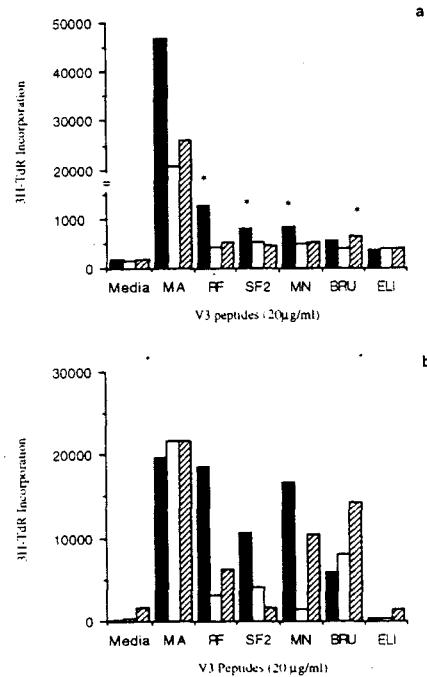


Figure 4. The induction of IL-2 and IL-3 production with individual V3 peptides in T cells derived from CBA ($H-2^k$) ■, BALB/c ($H-2^d$) □, C57BL/6 ($H-2^b$) ▨ mouse strains previously immunized with MA. IL-2 (a) and IL-3 (b) levels were determined as described in the Table 3. $p < 0.05$, using Student's t test. Experiments were repeated three times and one representative experiment was shown.

3.2.2 Differential T-cell activation using V3 individual peptide antigens

Using IL-3 secretion as a broad marker of T cell activation, we observed that several individual V3 peptides which did not induce IL-2 secretion, induced IL-3 secretion (Fig. 4a and b). Thus, T cell recognition appears less restrictive than observed when using IL-2 secretion and T cell proliferation as sole criteria. These results are similar to observations made by other laboratories [26–29] which showed that amino acid substitutions in the TCR ligand can dissociate T cell cytokine production from T cell proliferation. Thus, the mixotope elicited a broadly T cell repertoire of T cells of related specificity.

4 Concluding remarks

Recently, new approaches have been used in the identification of ligand-binding activity [30–33]. These approaches used phage or resin bead libraries to screen molecules that bind with high affinity to acceptor molecules (antibody, cell-surface receptor, drugs). Here, we report the first use of a peptide library in the context of vaccination.

The MA library of related HIV envelope V3 antigen peptides generated by combinatorial synthesis represents an immunogen able to elicit an immune response in various rodents with different MHC haplotypes. Since optimal activation of any specific T cell requires at least 200 peptide-MHC complexes containing the same peptide, and presented by one antigen-presenting cell [34, 35], it is unlikely that the MA library can be seen by the immune system as a set of 750 000 distinct V3 peptides. It has been shown, however, that more than 100 different V3 sequences obtained from randomly sequenced HIV-1 isolates can in fact be classified in subtypes of closely related V3 sequences [36, 37]. Therefore, the MA library can be considered paradoxically as both a random mixture, and a mixture containing major V3 species. In this context, we feel that the simplest interpretation of our findings is that the MA may allow a broad presentation of a limited number of V3 sequences, selected into dominant clusters by the MHC, and which will elicit a limited number of specific T cells that may recognize most cross-reactive V3 sequences. Additional investigation is needed to clarify the influence of the antigen-presenting cells (the nature of the cells and of their antigen processing, density and type of the MHC molecule expression) in the selection of antigenic peptides in the context of such a peptide library.

Analysis of the T cell response, including IL-3 secretion, indicates that T cells from MA-immunized animals were in fact broadly reactive. Based on the heteroclism of T cell recognition, the MA leads to a blurred image of V3 antigenic peptides. However, the most divergent peptide (ELI) did not restimulate T cells suggesting that T cell repertoire remains specific. This result, together with the observation that rodents at 1 year after immunization with the mixotope did not show any sign of illness, suggests that autoimmunity elicited by such a preparation may not represent a major risk. However, such a possibility remains to be further investigated.

The significance of IL-3 secretion in response to antigen stimulation, in the absence of T-cell proliferation and IL-2 secretion, needs to be investigated. Recent observations made by several laboratories [26–29, 38–41] indicate that: i) the central region of the peptide (anchor spacer) may be less restricted by MHC interaction and more accessible for direct interaction with the T cell receptor; ii) changes in amino acid peptide sequence can lead to distinct T cell signaling, *i.e.* to different T cell functional responses, as well as to T cell receptor antagonism. Therefore, antigenic stimulation of the T cell receptor by the MA could generate different intracellular signals to V3-specific T cells, with various functional consequences that may not have been completely explored in this study, and may account for the dissociated IL-3 responses that we observed. A possible way to improve the immune response may be to use as an immunogen of a mixotope antigen library of restricted degeneracy, that would still encompass the dominant clusters of V3 sequences.

A combinatorial library could provide an interesting model to evaluate the role of antagonist and agonist peptides during immune response. The mixotope may also represent a useful approach in the search for universal combinatorial agretopes eliciting a large T cell repertoire and could therefore have implications in the field of vaccine strategies.

We thank Marguerite M. for her help and Giannini S. for reviewing the manuscript.

Received February 1, 1994; in revised form July 21, 1994; accepted August 22, 1994.

5 References

- 1 Berzofsky, J., *Science* 1985. 229: 932.
- 2 Buus, S., Sette, A., Colon, S., Miles, C. and Grey, H., *Science* 1987. 235: 1353.
- 3 Sette, A., Buus, S., Colon, S., Smith, J., Miles, C. and Grey, H., *Nature* 1987. 328: 395.
- 4 Bjorkman, P., Saper, M., Samraoui, B., Bennett, W., Strominger, J. and Wiley, D., *Nature* 1987. 329: 506.
- 5 Brown, J., Jardetzky, T., Gorga, J., Stern, L., Urban, R., Strominger, J. and Wiley, D., *Nature* 1993. 364: 33.
- 6 Sinigaglia, F., Guttinger, M., Kilgus, J., Doran, D., Matile, H., Etlinger, H., Trzeciak, A., Gillessen, D. and Pink, J., *Nature* 1988. 326: 778.
- 7 Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termitjelen, A., Demotz, S., Corradin, G. and Lanzavecchia, A., *Eur. J. Immunol.* 1989. 19: 2237.
- 8 Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H., *Nature* 1991. 351: 290.
- 9 Kropshofer, H., Max, H., Müller, C., Hesse, F., Stevanovic, S., Jung, G. and Kalbacher, H., *J. Exp. Med.* 1992. 175: 1799.
- 10 Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. and Wiley, D., *Nature* 1991. 353: 326.
- 11 Romero, P., Corradin, G., Luescher, I. and Maryanski, J., *J. Exp. Med.* 1991. 174: 603.
- 12 Fremont, D., Matsumura, M., Stura, E., Peterson, P. and Wilson, I., *Science* 1992. 257: 919.
- 13 Guo, H.-C., Jardetzky, T., Garrett, T., Lane, W., Strominger, J. and Wiley, D., *Nature* 1992. 360: 364.
- 14 Rudensky, A., Preston-Hurlburt, P., Ramadi, B., Rothbard, J. and Janeway, C., *Nature* 1992. 359: 429.

- 15 Madden, D., Gorga, J., Strominger, J. and Wiley, D., *Cell* 1992. 70: 1035.
- 16 Buxton, S. E., Benjamin, R. J., Clayberger, C., Parham, P. and Krensky, A., *J. Exp. Med.* 1992. 175: 809.
- 17 Matsumura, M., Fremont, D., Peterson, P. and Wilson, I., *Science* 1992. 257: 927.
- 18 Latron, F., Pazmany, L., Morrison, J., Moots, R., Saper, M., Mc Michael and Strominger, J., *Science* 1992. 257: 964.
- 19 Silver, M., Guo, H.-C., Strominger, J. and Wiley, D., *Nature* 1992. 360: 367.
- 20 Good, M., Pombo, D., Quakyi, I., Riley, E., Houghten, R., Menon, A., Alling, D., Berzofsky, J. and Miller, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988. 85: 1199.
- 21 Graham, C., Warren, A. and Thomas, B., *Int. Immunol.* 1992. 4: 917.
- 22 Wolfs, T., DeJong, J., Van Den Berg, H., Tijnagel, M., Krone, W. and Goudsmid, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990. 87: 9938.
- 23 Gras-Masse, H., Ameisen, J.-C., Boutillon, C., Rouaix, F., Bossus, M., Deprez, B., Neyrinck-Capron, A. and Tartar, A., *Peptide Res.* 1992. 5: 211.
- 24 Putney, S., LaRosa, G., Matthews, T., Emini, E., Bobswell, R., Bolognesi, D. and Weinhold, K., in Girard, M. and Valette, L. (Eds.), *Quatrième Colloque des Cent Gardes, Pasteur Vaccins*, 1990. p. 189-193.
- 25 Mosmann, T., Schuacher, N., Street, Rudd, R., O'Garra, A., Fong, T., Bond, M., Moore, K., Sher, A. and Fiorentino, D., *Immunol. Rev.* 1992. 123: 209.
- 26 Evavold, B. and Allen, P., *Science* 1991. 252: 1308.
- 27 Soloway, P., Fish, S., Passmore, H., Gefter, M., Coffee, R. and Manser, T., *J. Exp. Med.* 1992. 174: 847.
- 28 Racioppi, L., Ronchese, F., Matis, L. and Germain, R., *J. Exp. Med.* 1993. 177: 1047.
- 29 Sloan-Lancaster, J., Evavold, B. and Allen, P., *Nature* 1993. 363: 156.
- 30 Scott, J. and Smith, G., *Science* 1991. 249: 386.
- 31 Cwirla, S., Peters, E., Barett, R. and Dower, W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990. 87: 6378.
- 32 Oldenburg, K., Loganathan, D., Goldstein, I., Schultz, P. and Gallop, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992. 89: 5393.
- 33 Lam, K., Salmon, S., Hersh, E., Hruby, V., Kazmierski, W. and Knapp, R., *Nature* 1991. 354: 82.
- 34 Harding, C. and Unanue, E., *Nature* 1990. 346: 574.
- 35 Demotz, S., Grey, H. and Sette, A., *Science* 1990. 249: 1028.
- 36 Myers, G., Berzofksy, J. A. and Korber, B., *Human Retroviruses and AIDS*, Los Alamos National Laboratory, New Mexico, 1992.
- 37 McCutchan, F. E., Lowagie, J. and Mascola, J., *Genetic subtypes of HIV-1. Retroviruses of human AIDS and related animal diseases*. Colloque des cent gardes, Paris, 1992.
- 38 De Magistris, T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaeta, F., Grey, H. and Sette, A., *Cell* 1992. 68: 625.
- 39 Ostrov, D., Hrieger, J., Sidney, J., Sette, A. and Concannon, P., *J. Immunol.* 1993. 150: 4277.
- 40 Alexander, J., Snoke, K., Ruppert, J., Sidney, J., Wall, M., Southwood, S., Oseroff, C., Arrhenius, T., Gaeta, F., Colon, S., Grey, H. and Sette, A., *J. Immunol.* 1993. 150: 1.
- 41 Liu, Z., Williams, K., Chang, Y. and Smith, J., *J. Immunol.* 1993. 151: 1852.

ARTICLE 5

**Variability in the human
immunodeficiency virus (HIV-1) V3
domain leads to distinct T helper cell
responses.**

Estaquier J., Boutillon C., Ameisen J-C., Tartar A., and C. Auriault.

J. Virol. en cours de préparation

Ce dernier travail explore de manière plus détaillée la réponse immune des séquences V3 (RF, MN, BRU, SF2, et MN) ainsi que leurs rôles quant à l'induction et la réactivation de sous-populations TH1-TH2. Un accent particulier a été mis quant à la détection des cytokines produites par les cellules T.

Les tests utilisés sont:

- a) Un test de prolifération cellulaire par incorporation de thymidine tritiée.
- b) Le dosage des cytokines
 - par activités biologiques:
 - * IL-2 par l'utilisation de la lignée CTLL-2.
 - * IL-3 par la lignée 32DCL.
 - * IFN- γ par la lignée WEHI-279.
 - par dosage enzymatique du type ELISA, à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-cytokines.
 - * IL-4.
 - * IL-5.
 - Par la technique d'amplification génique PCR ("Primer Chain Reaction") nous permettant de détecter l'IL-4 et l'IFN- γ de rat.
- c) La détection par ELISA des anticorps spécifiques.

Nous montrons que:

1) Les différents peptides V3 s'avèrent être immunogènes. Du point de vue de la cross-réactivité entre les différents peptides V3, seuls les variants RF et SF2, qui présentent entre eux 8% de divergence, s'avèrent être reconnus par les anticorps des 2 spécificités. Toutefois, cette faible divergence est suffisante pour annihiler l'immunogénicité du peptide RF chez le rat Fischer.

2) L'étude de l'immunogénicité du mixotope, en regard de la nature du profil des cytokines sécrétées, montre l'existence de sous-populations TH1 et TH2, et ce, en l'absence d'IL-4 détectable quelques soient les différents haplotypes incriminés.

3) Enfin, l'étude approfondie du profil des cytokines en regard des séquences V3 utilisées pour restimuler les cellules T, spécifiques du mixotope, ne permet toujours pas de répondre à la question:

S'agit-il des mêmes cellules T susceptibles de sécréter différentes cytokines relativement à la nature de la séquence peptidique, ou de populations distinctes induites par le mixotope?

Néanmoins, ces résultats s'avèrent cruciaux quant à la compréhension des mécanismes d'échappements possibles des agents infectieux vis-à-vis du système immunitaire. Ainsi, l'éducation de populations TH1-TH2 déterminée par la nature de la séquence virale peut être majeur dans le contrôle ou l'exacerbation de la maladie. Les approches d'antigénicité peptidiques nécessitent donc d'être réévaluées au cours de pathologie en regard de la sécrétion des cytokines, tout spécialement lorsqu'il s'agit d'agents infectieux variables.

**VARIABILITY IN THE HUMAN
IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV-1) V3 DOMAIN
LEADS TO DISTINCT T HELPER CELL RESPONSES.**

Estaquier, J.#§, Boutillon C.¶, Ameisen J.C.#, Tartar A.¶,
and C. Auriault*.

Estaquier, J., Ameisen J.C. Unité INSERM U415, Institut Pasteur, Lille,
France.

* Auriault C. Unité CNRS 1854, Institut Pasteur, Lille.

¶ Boutillon C. and Tartar A. Laboratoire de Chimie des Biomolécules, URA-
CNRS 1309, Institut Pasteur, Lille, France.

§ To whom correspondance should be addressed.

Running Title: Immune Response to HIV V3 peptides.

Key words: HIV, V3 peptides, Immune response, Cytokines.

ABSTRACT

The hypervariable domain of the HIV gp120, the V3 loop domain, represents a target for neutralizing antibodies and for HIV vaccine strategies. In this study, we have investigated in murine species the potential cross reactivity of immune responses directed against individual V3 peptides, derived from distinct HIV sequences (BRU, RF, SF2, MN, and ELI sequences), and against a combinatorial peptide library, composed of 750 000 related V3 peptides. We observed that immunogenic V3 peptides elicit a specific B- and T-cell immune response that is mainly restricted to the sequence of the immunizing peptide. T-cell activation that depends on T-cell receptor recognition of peptides bound to the molecules encoded by the major histocompatibility complex, was significantly influenced by changes in the peptide amino acid sequence. The combinatorial V3 peptide library induced a more broadly reactive immune response, especially when T-cell cytokine secretion was used as a readout for restimulation of T-cells with individual V3 peptides. Our data suggest that amino acid variations in antigenic peptide sequences lead to different transducing signals in the T-cells and to the generation of distinct functional TH1 or TH2 cell subpopulations. These observations may have implications in the field of viral infection control and in the design of vaccine strategies.

INTRODUCTION

Variations in the amino acid sequence of antigenic peptides affect B-cell and T-cell response to antigen (1-3). In contrast to B-cells, that recognize soluble antigens, T lymphocytes recognize antigens as peptide fragments in association with MHC molecules on the surface of antigen-presenting-cells (4, 5). The generation of an effective immune response to foreign antigens depend on the initiation of a T helper cell response and is therefore regulated by molecules encoded by the major histocompatibility complex (MHC) (6).

Several approaches have been used to determine amino acids involved in MHC (agretope) or TCR (epitope) binding sites. Critical residues on peptide antigens have been mapped by using amino acid substitutions (7-12). The importance of MHC polymorphisms on the specificity of the interactions between peptide and MHC has been assessed using site-directed mutagenesis (13-19). Recently, crystallography of the MHC molecules (20-21) and peptide elution studies have provided additional information (22-25). MHC molecules can select peptides according to the complementarity between their allele-specific pockets in the MHC groove and the side chains of the amino acid residues in antigenic peptides that represent allele motifs; such allele motifs include a pair of amino acids referred to as anchor residues, separated by a variable anchor spacer sequence that extrude into the groove (26-29).

B- and T-cell response to the envelope glycoprotein (gp120) are an important component of the specific immune response to HIV infection (30-32). These responses include the recognition of an invariant antigenic domain from the hypervariable V3 loop of HIV-1 gp120 that plays an important role in the generation of neutralizing antibodies and in the tropism of HIV. Peptides derived from this domain have been shown to be immunogenic and to elicit HIV neutralizing antibodies (33-38).

In the present study, we have analyzed the immune response against individual V3 peptides from distinct HIV sequence isolates (BRU, MN, RF, SF2, and ELI) and against a combinatorial peptide library, composed of 7.5×10^5 related V3 peptides, called mixotope (39). Since variation in the HIV proteins is one way by which the virus evades neutralizing antibodies (40, 41) and also escapes possible control by cytotoxic T-cells (42-45), we investigated whether genetic variation in the HIV V3 loop may also modify the T helper (TH) cell immune response. Here, we have analyzed in different strains of rodents the fine specificity and the cross-reactivity of the B-cell and T-cell response to individual V3 peptide sequences and to a combinatorial library that represents an interesting model to explore antigenic variability in the context.

MATERIALS AND METHODS

2.1 Media and reagents: For all cultures, RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France), containing 20 mM HEPES (Sigma, St Louis, MO), 100 U penicillin/ml, 100 µg streptomycin/ml (Specia, Paris, France) and 10% heat inactivated FCS (Gibco) was usually supplemented with 2 mM L-glutamine, 5x10⁻⁵ M β-mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, FRG) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco).

2.2 Animals: Fischer (RT-1^{iv1}), and Lou M (RT-1^u) females syngeneic rat strains were bred and maintained in the animal unit of the Institut Pasteur; Balb/c (H-2^d), C57bl/6 (H-2^b), and CBA (H-2^k) females mice were obtained from IFFA CREDO.

2.3 Peptide synthesis: The mixotope antigen was synthesized as previously described (39, 46), using the BOC-TFA scheme and an Applied Biosystems Model 430A peptide synthetizer (Foster City, CA), on a t-BOC-pMeBzl-Cys PAM resin (1 mmol; loading of the starting resin: 0.72mmol/g). Side chain protecting groups were: Glu (Obzl), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Arg (Tos), Tyr (BrZ), Cys (4-MeBzl), Met (O), and His (Bom). Each peptide was treated twice with 20% mercaptoethanol / 2% DIEA in DMF for 120 min in order to remove the DNP group protecting the histidine residue. Peptidyl-resin cleavage and side chain deprotection was performed by low and high hydrogen fluoride (HF) procedure when side chain sulfoxide protection was used on Met, or high HF for all other peptidyl-resins. Crude peptides were purified by preparative reverse-phase HPLC and analyzed for identity by PD-MS (plasma desorption mass spectrometry).

The individuals V3 sequences used were the RF, BRU, MN, SF2, and ELI peptides, and divergence between the amino acid sequence of these peptides are indicated in the table 1:

BRU: TRPNNNTRKSIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAHC,
MN: TRPNYNKRKRIHIGPGRAFYTTKNIIGTIRQAHC,
SF2: TRPNNNTRKSIYIGPGRAFHTTGRIIGDIRKAHC,
RF: TRPNNNTRKSITKGPGRVIYATGQIIGDIQKAHC,
ELI: ARPYQNTRQRTPIGLGQSLYTTRSRHSIIGQAHC;

The mixotope antigen was composed by the following peptide sequence in which degenerated amino acids are indicated in the bracket:
 NNT(KR)(KR)(GRS)I(HPRPSTY)(IMR)(-Q)(-R)GPGR(AV)(FILV)(HVY)
 (AT)(IRT)(EGK)(KQ)(-I)IGC

2.4 Immunization procedure: Rodents were immunized at the base of the tail either with 100 µg (rats) or 50 µg (mice) of peptides in complete Freund's adjuvant (CFA) (Difco, Detroit, MI). Twenty days later, animals were boosted using the same way with half amount of antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (IFA).

2.5 Proliferation assay: Five days after the last immunization the draining lymph nodes and the spleen were removed. T lymph node cells from rats were purified by passage through a nylon wool column. A total of 5×10^5 T cells were cultured with 5×10^5 syngeneic irradiated antigen-presenting-cells (30 Grey, Philips RT) from thymic rat and antigen in flat-bottomed 96 wells plates (Falcon, Becton Dickinson, France) in a humidified CO₂ incubator at 37°C.

Five days later, a pulse with 18,5 KBq of 3H-TdR to each well (CEA, Gif-sur-Yvette, France) was made in order to measure T cell proliferation; 12 to 16 hrs later the wells were harvested onto glass fiber filter strips using a multiharvester (Skatron, Liergyen, Norway) and the radioactivity incorporated into DNA was determined by liquid scintillation counting (LKB, Wallac, Turku-Finland).

2.6 Cytokine secretion assays: Supernatants from spleen and lymph node T cells (10^6 cells/ml) of immunized rodents were analyzed for lymphokine secretion after antigen restimulation *in vitro*.

IL-2 production was tested using an IL-2 dependent T-cell line (CTLL-2, ATCC). CTLL-2 (10^4 cells) were added to the appropriate antigen supernatants and incubated during 24 hrs including a 10 hr pulse with tritiated thymidine (0.5 µCi/well) before harvesting. Units of IL-2 was determined by comparison to standard curves using recombinant IL-2 (Genzyme)

IL-3 production was measured using an IL-3 dependent cell line (32D CL, ATCC). 32D CL (10^4 cells) were added to the supernatants and incubated during 48 hr before 3H-TdR labelling.

IL-5 production from rats was measured using an IL-5 dependent cell line (Ly H7 B13, ATCC). Samples were incubated with 10^4 cells during 48 hrs and pulsed with 3H-TdR.

IFN γ was measured using a B-cell lymphoma sensitive cell line (WEHI-279, ATCC). Cell proliferations (10^4 cells) were determined by 18hr of 3H-TdR incorporation after 3 days of culture.

IL-4 and IL-5 production from mice were determined by ELISA. Briefly, samples were analyzed with pairs of rat anti-IL-5 and anti-IL-4 mAb in a two-site sandwich ELISA. Microtiter plate wells were first coated with the

monoclonal antibody (1 µg/ml) at 4°C overnight. Plates were then washed (PBS, tween 1%) and blocked by the addition of 1% BSA in PBS. Samples and standard dilutions (rIL-4 and rIL-5 lymphokines) were added and incubated for 2 hrs. Plates were washed and the antibody-biotin conjugate (1 µg/ml) was added for 1 hr at room temperature. Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate was incubated for 1 hr, washed extensively and revealed with substrate (OPD, orthophenylenediamine, Sigma), in solution phosphate buffer 0.1 M, pH 5.5 containing H₂O₂. The optical density was measured through a multichannel spectrophotometer at 492 nm.

2.7 Cytokine mRNA: Total cellular RNA were extracted from 20 x 10⁶ spleen cells 18 hrs after *in vitro* restimulation with antigen using the RNazol procedure (Bioprobe, France) and precipitated. Reverse transcription was performed using 2 µg of total RNA. Aliquots of the RT-RNA were amplified in a 50 µl reaction volume containing oligonucleotide primers (0.5 µM) to the β-actin and the IL-4, 200 µM of deoxynucleotide triphosphate (dNTP) (Pharmacia), 60 mM KCL, 50 mM Tris-HCl, ph 8.3, 5 mM MgCl₂. PCR products, amplified using (Perkin Elmer/Cetus Thermocycler) 25, 35 and 45 cycles, respectively for β-actin, γ-IFN and IL-4, were subjected to electrophoresis on 2% agarose gels, visualized by staining with ethidium bromide or hybridized with ³²P-labelled IL-4 probes (kindly provided by J. McKnight).

2.8 Antibody ELISA assay: Microtiter plate wells (Nunc, Denmark) were coated for 24 hr at 4°C with 0.5 µg/0.1 ml of synthetic peptides or the vaccinia-recombinant purified gp160 HIV-1 LAVbru (kindly provided by T. Idziorek). The plates were saturated before addition of the appropriate dilutions of sera (1/50^e). IgG were detected by a rabbit anti-rat peroxidase (ICN biomedicals, Lisle, IL) and revealed with OPD substrate. The optical density was determined at 492 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 B- and T-cell immunogenicity of V3 peptides.

Humoral responses from two rat strains (Lou M and Fischer) immunized with individual V3 peptides (BRU, MN, RF, SF2, and ELI) were analyzed. Divergence between the amino acid sequence of these peptides ranged from 7% to 52% (Table 1). Results are summarized in Table 2. All peptides induced an antibody response against themselves, except the RF peptide that was immunogenic in the Lou M rat strain only. IgG antibodies elicited by RF and SF2 peptide immunizations were the main antigenic cross-reactive antibodies. Divergence between the sequence of both peptides was 8% only. However, divergence of 7% only between SF2 and MN did not result in a similar cross-reactivity indicating that the degree of homology shared by two peptides was not sufficient to determine the induction of a cross reactive immune response.

We investigated the ability of V3 peptides to generate specific T-cells (Fig. 1). In both rat strains, all peptides stimulated specific T-cell responses as assessed by T-cell proliferation after *in vitro* restimulation with the same V3 peptides, except the RF peptide that generated specific T-cells only in Lou M rat strain. These results suggested that the inability of the RF peptide to elicit T-cell and B-cell responses in the Fischer rat strain could be related to the absence of a T-cell determinant in the RF peptide sequence. Proliferative responses of T-cells from MN, BRU, and SF2 immunized rats were restricted to the immunizing peptides. Interestingly, T-cells from Lou M rats immunized with RF peptide were restimulated by the combinatorial V3 peptide library which represents 750 000 related V3 peptides (Fig. 1a).

3.2 Analysis of the immune response elicited by a combinatorial peptide library.

We then investigated the immune repertoire elicited by the combinatorial V3 peptide library, called mixotope (MA). MA induced a specific B-cell response in both haplotypes (Fig. 2). Among individual V3 peptide sequences, antibodies from Lou M and Fischer rat strains immunized with MA recognized the BRU and the RF peptides, respectively. In addition, these MA specific antibodies recognized the recombinant gp160 HIVbru protein. Outbred rat strains immunized with MA also produced specific antibodies that recognized the BRU peptide and the gp160 protein.

T-cell activation was assayed by measuring both proliferation and cytokine secretions. In all rat strains immunized with MA in Freund's adjuvant, T-cells from both the spleen and the lymph node organs proliferated (Fig. 1 f, k) and secreted IL-2, IFN- γ and IL-5 cytokines (Fig. 3) in response to MA. No T-cell response to MA was observed in rats immunized with Freund's adjuvant alone. Since in the rat no specific reagent exist for the detection of the IL-4 protein, we used PCR in order to explore IL-4 mRNA expression.

In contrast to IFN- γ , that was also easily detected at the mRNA level using PCR (Fig. 4), no IL-4 message could be observed in either Lou and Fischer rat strains. After hybridization with a specific probe, IL-4 message could be detected, but was not significantly increased following restimulation with MA from rats immunized with MA (data not shown). These results are consistent with our cytokine secretion findings in MA immunized mice (see later).

The identification of functional TH-cell subsets secreting distinct patterns of cytokines have increased the understanding of the immune regulation and the immune effector function of TH cells (47, 48). TH1 cells secrete IL-2, and IFN- γ cytokines, that mediate delayed type hypersensitivity responses, activate macrophages and play an key role in defence against intracellular pathogens, whereas TH2 cells secrete IL-4, IL-5, and IL-10 cytokines, that help B-lymphocytes and promote the synthesis of IgG1, IgE and IgA antibody isotypes. Other cytokines such as IL-3 are secreted by both TH1 and TH2 T-cells. TH0 cells have been described, that secrete IL-2, IFN γ , IL-4, and IL-5. Here, we observed a particular TH cytokine profile to MA, since IL-2 and IFN- γ were secreted in the presence of the IL-5 cytokine, but in the absence of IL-4.

3.3 Qualitative changes in cytokine secretion may be related to the peptide amino acid composition.

Next, we investigated the cytokines secreted by MA specific T-cells following restimulation with individual V3 peptides.

Immunization with the combinatorial V3 peptide antigen induced T-cell proliferation in response to restimulation with RF and MN peptides in the Lou M strain, whereas none of the peptides were able to restimulate T-cells from Fischer rats (Fig. 1 f, k). Depending on the MHC haplotype we observed that the minimal response of T-cells restimulated with individual V3 peptides involved the secretion of IL-5 and/or IFN- γ in the absence of IL-2 secretion and in the absence of T-cell proliferation (Fig. 5). No cytokine secretion was

observed in T-cells from rats immunized with Freund's adjuvant alone (not shown). ELI induced none of the cytokines tested; being the most divergent sequence, ELI can be considered as a control V3 peptide.

Cytokine secretion was further explored in the mouse model (Table 3). Three mouse strains Balb/c (H-2^d), CBA (H-2^k), and C57Bl/6 (H-2^b) were explored. As in the rat model, in all mouse strains immunized with MA, the T lymphocytes restimulated with MA secreted IL-2, IL-3, IFN- γ and IL-5 but no IL-4 cytokines. Since no IL-4 was detectable under our experimental conditions, the T-cell population generated by MA immunization seems to include TH1 cell subset and a particular subset of TH2 cells that secreted IL-5 but no IL-4. As in the rat model, the cytokine response of MA immunized mice varied depending on the peptide used for *in vitro* restimulation.

This suggests either that specific T-lymphocytes with different functional properties were elicited during immunization with MA or that peptide amino acid variations associated with the V3 domain significantly influenced the restimulation of T-cells, which require the recognition of peptides bound to MHC molecules. Difference in amino acid peptide sequence may thus generate distinct T-cell signals leading to particular cytokine secretion patterns.

CONCLUDING REMARKS

The observation that protective immune responses include B-cell and T-cell responses directed towards highly variable regions of virus surface proteins is not unique to HIV-1 infection. Other virus, such as influenza virus undergo antigenic shifts and drifts resulting from immune pressure which leads to new subtypes and possible escape mutants (42-45, 49). A critical question regarding amino acid variations within immunogenic domains concerns its importance to the immune system, especially to the T cell repertoire. Indeed, sequence changes could prevent the interaction of the processed antigenic fragment with the relevant MHC molecule; secondly, even if the variant peptide retains the ability to associate with MHC molecules, the sequence changes may affect interactions of the peptide-MHC complex with the TCR (50-53).

Our studies show that immunization with given V3 peptides results in a specific B- and T-cell immune response polarized on the sequence of the immunizing peptide, suggesting that small amino acid differences in peptide sequences are sufficient to limit immune recognition. Antibody cross-reactivity between RF and SF2 peptides could be related to the limited primary sequence divergence (54), but this difference in amino acid sequence was nevertheless insufficient to generate a cross-reactive T-cell response. The observation that amino acid variations in V3 peptides affect T-cell recognition was initially made by Callaham *et al.* (55) in T-cell clones. Our results using primary T-cells confirm this initial finding and underline the important role of the MHC molecule restriction in the context of peptide presentation.

The immune response to the combinatorial peptide library (MA) that contains 750 000 related peptides, which includes both B- and T-cell epitopes is very interesting since antibodies and T-cells elicited by the MA recognized distinct V3 variant peptides. Initially, it was been reported that peptides were usually not immunogenic, or only weakly immunogenic, when used in the absence of coupling to a carrier protein (56-59). From our study on peptides derived from the HIV nef protein, we have proposed that peptides can be immunogenic if they provide both T-cell and B-cell sites within the peptide sequence (60). The use of a library of closely related peptides that may contain either T-cell or B-cell sites (or both) represent a new method to generate *in vivo* a B- and T-cell response.

With regards to the T-cell response, it is noteworthy that peptide variants restimulated T-cells that secreted distinct profile of cytokines including TH1 cytokines (IL-2, and IFN- γ) and the TH2 cytokines (IL-4, IL-5,

and IL-10). We propose that such antigenic variants could lead to distinct T-cell signals and therefore to distinct T-cell function through changes in the interaction between peptide-MHC complexes and TCR. Accordingly, variation in amino acid composition could induce qualitative changes in the cytokine secretion pattern from a given T-cell. These observations are consistent with findings from other laboratories that have described closely related agonist and antagonist peptides able to give distinct signals to T-cells, resulting either in T-cell proliferation, anergy or apoptosis (61-64).

The possible correlation between the emergence of new viral subtypes and the evolution of the immune repertoire in the course of a viral infection needs to be re-evaluated, specifically with regards to the functional properties of the stimulated T-cells, including their differentiation towards TH1 and/or TH2 subsets. These T helper cell subsets could play an important role in the control of a viral infection and therefore represent a major parameter in the design of vaccine strategy.

Acknowledgement: We thank Gras-Masse H., and Giannini S. for discussing and reviewing the manuscript.

- 1) Rowlands, D.J., B.E. Clarke, A.R. Carroll, F. Brown, B.H. Nicholson, J.L. Bittle, R.A. Houghten, and R.A. Lerner. 1983. Chemical basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 306: 694-697.
- 2) Alexander, H., D.A. Johnson, J. Rosen, L. Jerabek, N. Green, I.L. Weissman, and R.A. Lerner. 1983. Mimicking the alloantigenicity of proteins with chemically synthesized peptides differing in single amino acids. *Nature*, 306: 697-699.
- 3) Getzoff, E.D., H.M. Geysen, S.J. Rodda, H. Alexander, J.A. Tainer, R.A. Lerner. 1987. Mechanisms of antibody binding to a protein. *Science*, 235: 1191-1196.1)
- 4) Buus, S., Sette, A., and H.M Grey. 1987. The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. *Immunol. Rev.* 98: 115-141.
- 5) Schwartz, R.H. 1986. Immune response (Ir) genes of the murine major histocompatibility complex. *Adv. Immunol.* 38: 31-201.
- 6) Buus, S., Sette, A., H.M. Grey. 1987. The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. *Immunol. Rev.* 98: 115-141.
- 7) Allen, P., G. Matsueda, R. Evans, J. Dunbar, G. Marshall, and E. Unanue. 1987. Identification of the T-cell and Ia contact residues of T-cell antigenic epitope. *Nature* 327: 713-715.
- 8) Fox, B., C. Chen, E. Fraga, C.A. French, B. Singh, and R.H. Schwartz. 1987. Functionally distinct agretopic and epitopic sites. *J. Immunol.* 139: 1578-1588.
- 9) Sette, A., S. Buus, S. Colon, J. Smith, C. Miles, and H. Grey. 1987. Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature*, 328: 395-39.
- 10) Millich, D., J. Hughes, R. Houghten, A. McLachlan, and J. Jones. 1989. Functional identification of agretopic and epitopic residues within an HBcAg T cell determinant. *J. Immunol.* 143: 3141-3147.

- 11) Brown, M.A., L.A. Glimcher, E.A. Nielsen, W. Paul, and R. Germain. 1986. T cell recognition of Ia molecules selectively altered by a single amino acid substitution. *Science*, 231: 255-258.
- 12) Hansburg, D., T. Fairwell, R.H. Schwartz, and E. Appella. 1983. The T lymphocyte response to cytochrome C. *J. Immunol.* 131: 319-324.
- 13) Davis, G.B., J.M. Buerstedde, D.J. McKean, P.P. Jones, H.O. McDevitt, and D.C. Wraith. 1989. The Role of Polymorphic I-A κ β Chain Residues in Presentation of a Peptide from Myelin Basic Protein. *J. Exp. Med.* 169: 2239-2244.
- 14) Davis, C.B., D.J. Mitchell, D.C. Wraith, J.A. Todd, S.S. Zamvil, H.O. McDevitt, L. Steinman, and P.P. Jones. 1989. Polymorphic residues on the I-A β modulate the stimulation of T cell clones specific for the N-terminal peptide of the autoantigen myelin basic protein. *J. Immunol.* 143: 2083-2093.
- 15) Reske-Kunz, A.B., D. Landais, J. Peccoud, C. Benoist, and D. Mathis. 1989. Functional sites on the A α -chain. *J. Immunol.* 143 : 1472-1481.
- 16) Norton, F.L., C.B. Davis, P.P. Jones, and J.W. Goodman. 1989. Arsonate-specific murine T cell clones. *J. Immunol.* 143: 446-451.
- 17) Rosloniec, E.F., L.J. Vitez, B.N. Beck, J-M Buerstedde, D.J. Mc Kean, C. Benoist, D. Mathis, and J.H. Freed. 1989. I-A κ polymorphisms define a functionally dominant region for the presentation of hen egg lysosome peptides. *J. Immunol.* 143: 50-58.
- 18) Krieger, J.I., R.W. Karr, H.M. Grey, W-Y. Yu, D. O'Sullivan, L. Batovsky, Z-L. Zheng, S.M. Colon, F.C.A. Gaeta, J. Sidney, M. Albertson, M.F. Del Guercio, R.W. Chestnut, and A. Sette. 1991. Single amino acid changes in DR and antigen define residues critical for peptide-MHC binding and Tcell recognition. *J. Immunol.* 146: 2331-2340.
- 19) Karr, R.W., W-Y. Yu, R. Watts, K.S. Evans, and E. Celis. 1990. The role of polymorphic HLA-DR β chain residues in presentation of viral antigens to T cells. *J. Exp. Med.* 172: 273-283.

- 20) Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, D.C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. *Nature*, 329: 506-511.
- 21) Brown, J., T. Jardetzky, J. Gorga, L. Stern, R. Urban, J. Strominger, D. Wiley. 1993. Three-Dimensional Structure of the Human Class II Histocompatibility Antigen HLA-DR1. *Nature*, 364: 33-39.
- 22) Falk, K., O. Rötzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H-G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351: 290-296.
- 23) Kropshofer, H., H. Max, C. Müller, F. Hesse, S. Stevanovic, G. Jung, and H. Kalbacher. 1992. Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact motif. *J. Exp. Med.* 175: 1799-1803.
- 24) Romero, P., G. Corradin, I. Luescher, and J. Maryanski. 1991. H-2Kd-restricted antigenic peptides share a simple binding motif. *J. Exp. Med.* 174: 603-612.
- 25) Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell*, 70: 1035-1048.
- 26) Buxton, S.E., R.J. Benjamin, C. Clayberger, P. Parham, and A.M. Krensky. 1992. Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (HLA) class I molecules: Analysis of the conserved B ("45") pocket of HLA-B27. *J. Exp. Med.* 175: 809-820.
- 27) Matsumura, M., D. Fremont , P. Peterson, and I. Wilson. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. *Science*, 257: 927-934.
- 28) Latron, F., L. Pazmany, Morrison, Moots R., Saper M., McMichael, and Strominger J. 1992. A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T cells. *Science*. 257: 964-967.
- 29) Orentas, R.J., J.E.K. Hildreth, E. Obah, M. Polydefkis, G.E. Silver, M.L., H-C. Guo, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. Atomic structure of

- a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature*, 360: 367-369.
- 30) Smith, M.L. Clements, R.F. Siliciano. 1990. Induction of CD4⁺ human cytolytic T cells specific for HIV-infected cells by a gp 160 subunit vaccine. *Science*, 248: 1234-1237.
- 31) Takahashi, H., T. Takeshita, B. Morein, S. Putney, R.N. Germain, and J.A. Berzofsky. 1990. Induction of CD8⁺ Cytotoxic T Cells by Immunization with Purified HIV-1 Envelope Protein, in ISCOMs. *Nature*, 344: 873-875.
- 32) Hoffenbach, A., P. Langlade-Demoyen, G. Dadaglio, E. Vilmer, F. Michel, C. Mayaud, B. Autran, and F. Plata. 1989. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 142: 452-462
- 33) Javaherian, K., A.J. Langlois, C. McDanal, K.L. Ross, L.I. Eckler, C.L. Jellis, A.T. Profy, J.R. Rusche, D.P. Bolognesi, S.D. Putney, and T.J. Matthews. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6768-6772.
- 34) Goudsmit, J., C. Debouck, R.H. Meloen, L. Smit, M. Bakker, D.M. Asher, A.V. Wolff, C.J. Gibbs, and D.C. Gajdusek. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4478-4482.
- 35) Rusche, J.R., K. Javaherian, C. McDanal, J. Petro, D.L. Lynn, R. Grimalia, A. Langlois, R.C. Gallo, L.O. Arthur, P.J. Fischinger, D.P. Bolognesi, S.D. Putney, and T.J. Matthews. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope, gp 120. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3198-3202.
- 36) Takahashi, H., J. Cohen, A. Hosmalin, K.B. Cease, R. Houghten, J.L. Cornette, C. DeLisi, B. Moss, R.N. Germain, and J.A. Berzofsky. 1988. An immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp160 recognized by class I major histocompatibility complex molecule-restricted murine cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3105-3109.

- 37) Manca, F., J.A. Habeshaw, A.G. Dalgleish, D. Fenoglio, G. Li Pira, and E.E. Sercarz. 1993. Role of flanking variable sequences in antigenicity of consensus regions of HIV gp120 for recognition by specific human T helper clones. *Eur. J. Immunol.* 23: 269-274.
- 38) Shioda, T., J.A. Levy, and C. Chen-Mayer. 1992. Small amino Acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9434-9438.
- 39) Gras-Masse, H., J-C. Ameisen, C. Boutillon, F. Rouaix, M. Bossus, B. Deprez, J-L. Neyrinck, A. Capron, and A. Tartar. 1992. Synthetic vaccines and HIV-1 hypervariability: A "mixotope" approach. *Peptide Research.* 5: 4.
- 40) Masuda, T., S. Matsushita, M.J. Kuroda, M. Kannagi, K. Takatsuki, and S. Harada. 1990. Generation of neutralization-resistant HIV-1 in vitro due to amino acid interchanges of third hypervariable *Env* region. *J. Immunol.* 145: 3240-3246.
- 41) Zwart, G., H. Langedijk, L. Van Der Hoek, J-J. De Jong, T.F.W. Wolfs, C. Ramautarsing, M. Bakker, A. De Ronde, and J. Goudsmit. 1991. Immunodominance and antigenic variation of the principal neutralization domain of HIV-1. *Virol.* 181: 481-489.
- 42) Phillips, R.E., S. Rowland-Jones, D.F. Nixon, F.M. Gotch, J.P. Edwards, A.O. Ogunlesi, J.G. Elvin, J.A. Rothbard, C.R.M. Bangham, C.R. Rizza, and A.J. McMichael., 1991. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature,* 354: 453-459.
- 43) Klenerman, P., S. Rowland-Jones, S. McAdam, J. Edwards, S. Daenke, D. Laloo, B. Köppe, W. Rosenberg, D. Boyd, A. Edwards, P. Giangrande, R.E. Phillips, and A.J. McMichael. 1994. Cytotoxic T-cell activity antagonized by naturally occurring HIV-1 Gag variants. *Nature,* 369: 403-407.
- 44) Bertoletti, A., A. Sette, F.V. Chisari, A. Penna, M. Levrero, M. De Carli, F. Fiaccadori, and C. Ferrari. 1994. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature,* 369: 407-410.

- 45) Couillin, E., B. Culmann-Penciolelli, E. Gomard, J. Choppin, J-P. Levy, J-G. Guillet, and S. Saragosti. 1994. Impaired cytotoxic T lymphocyte recognition due to genetic variations in the main immunogenic region of the human immunodeficiency virus 1 Nef protein. *J. Exp. Med.* 180: 1129-1134.
- 46) Estaquier, J., H. Gras-Masse, C. Boutillon, J-C. Ameisen, A. Capron, A. Tartar, and C. Auriault. 1994. The mixotope: a combinatorial peptide library as a T-cell and B-cell immunogen. *Eur. J. Immunol.* 24: 2789-2795.
- 47) Bottomly, B. 1988. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. *Immunol. Today*, 9: 268-273.
- 48) Scott, P. 1993. Selective differentiation of CD4⁺ T helper cell subsets. *Current Opinion Immunol.* 5: 391-397.
- 49) Graham, C.M., A.P. Warren, and D.B. Thomas. 1992. Do antigenic drift residues in influenza hemagglutinins of the H3 Subtype qualify as contact sites for MHC class II interaction? *International Immunol.* 4: 917-922.
- 50) Zhuoru, L., K.P. Williams, Y-H. Chang, and J.A. Smith. 1993. Immunodominance: A single amino acid substitution within an antigenic site alters intramolecular selection of T cell determinants. *J. Immunol.* 151: 1852-1858.
- 51) Alexander, J., K. Snoke, J. Ruppert, J. Sidney, M. Wall, S. Southwood, C. Oseroff, T. Arrhenius, F.C.A. Gaeta, S.M. Colon, H.M. Grey, and A. Sette. 1993. Functional consequences of engagement of the T cell receptor by low affinity ligands. *J. Immunol.* 150: 1-7.
- 52) Ostrov, D., J. Krieger, J. Sidney, A. Sette, and P. Concannon. 1993. T cell receptor antagonism mediated by interaction between T cell receptor junctional residues and peptide antigen analogues. *J. Immunol.* 150: 4277-4283.
- 53) De Magistris, M.T., J. Alexander, M. Coggeshall, A. Altman, F.C.A. Gaeta, H.M. Grey, and A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*, 68: 625-634.

- 54) Neurath, A.R., and N. Strick. 1990. Confronting the hypervariability of an immunodominant epitope eliciting virus neutralizing antibodies from the envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Molecular Immunol.* 27: 539-549.
- 55) Callahan, K.M., M.M. Fort, E.A. Obah, E.L. Reinherz, and R.F. Siliciano. 1990. Genetic variability in HIV-1 gp120 affects interactions with HLA molecules and T cell receptor. *J. Immunol.* 144: 3341-3346.
- 56) Anderer, F. 1963. Preparation and properties of an article antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. *Biochem. Biophys. Acta*, 71: 246.
- 57) Langbeheim, H., R. Arnon, and M. Sela. 1976. Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73: 4636.
- 58) Müller, G., M. Shapira, and R. Arnon. 1982. Anti-influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 569.
- 59) Niman, H., R. Houghten, L. Walker, R. Reisfeld, I. Wilson, J. Hogle, and R. Lerner. 1983. Generation of protein-reactive antibodies by short peptides is an event of high frequency: Implications for the structural basis of immune recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4949.
- 60) Estaquier, J., C. Boutillon, H. Gras-Masse, J.C. Ameisen, A. Capron, A. Tartar, and C. Auriault. 1993. Comprehensive delineation of antigenic and immunogenic properties of peptides derived from the nef HIV-1 regulatory protein. *Vaccine*. 11:1083-1092.
- 61) Racioppi, L., F. Ronchese, L.A. Matis, and R.N. Germain. 1993. Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling. *J. Exp. Med.* 177: 1047-1060.

- 62) Sloanne-Lancaster, J., B.D. Evavold, and P.M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature*, 363: 156-159.
- 63) Evavold, B.D., and P.M. Allen. 1991. Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*, 252: 1308-1310.
- 64) Soloway, P., S. Fish, H. Passmore, M. Gefter, R. Coffee, and T. Manser. 1991. Regulation of the immune response to peptide antigens. Differential induction of immediate-type hypersensitivity and T cell proliferation due to changes in either peptide structure or major histocompatibility complex haplotype. *J. Exp. Med.* 174: 847-858.

LEGEND

Fig. 1: Rat T-cell proliferative responses.

Lou M (a, b, c, d, e and f) and Fischer (g, h, i, j and k) rat strains were immunized with the different synthetic peptides RF (a, g); SF2 (b, h); ELI (c); BRU (d, j); MN (e, i); MA (f, k). T-cells were restimulated using the different peptides (RF Δ ; SF2 \blacktriangle ; ELI \circ ; BRU \blacksquare ; MN \square ; and MA \bullet). Proliferation was determined after five days of culture by 3H-TdR incorporation.

Fig. 2: Rat antibody responses.

Fischer (\bullet), Lou M (\circ) and an outbred (Δ) rat strains were immunized with MA. Antibodies from individual animal were analyzed against the different peptides BRU, MN, ELI, SF2, RF, MA and the recombinant gp160. Optical density (O.D.) was determined at 492 nm.

Fig. 3: Cytokine secretions from rat.

Fischer (a, c, e) and Lou M (b, d, f) rat strains were immunized with the combinatorial peptide library (\blacksquare , \square) or with Freund's adjuvant alone (\diagup , \diagdown). Cytokines IL-2 (a, b); IL-5 (c, d); and IFN- γ (e, f) were analyzed from T cells derived from lymph nodes (\blacksquare , \diagup) or spleen (\square , \diagdown) and restimulated either with medium alone, MA or Con A.

Fig. 4: Cytokine RNA message from rat.

IFN γ and IL-4 compared to β -actin were carried out by PCR approach from Lou M (1-6) and Fischer (7-12) rat spleen cells immunized with either MA (4-6, 7-9) or Freund's adjuvant alone (1-3, 10-12) and restimulated *in vitro* for 20 hr with medium alone (1, 4, 7, 10), MA (2, 5, 8, 11) and Con A (3, 6, 9, 12).

Fig. 5: Cytokine secretions related to V3 sequences in rat.

Lou M (\square) and Fischer (\blacksquare) rat strains were immunized with the combinatorial peptide library and T-cells were restimulated with the different synthetic peptides. Specific supernatants were analyzed for IL-2 (a, b), IL-5 (c, d) and IFN- γ (e, f) cytokine secretions.

Table 1: Divergence scores of V3 peptides.

Divergence scores were calculated by summing scores for each amino acid replacement within the sequence and by adding 2.2 for each amino acid residue

represented in one but not in the paired sequence and 6.0 for each gap in the sequence.

Table 2: Rat humoral responses.

Fischer, Lou M rat strains were immunized with the different peptides BRU, MN, ELI, SF₂ and RF. Antibodies from individual animal were analyzed against the different peptides. Optical density (O.D.) was determined at 492 nm. (- < 0,150; 0,150 < ± < 0,500; 0,500 < + < 1,000; 1,000 < ++ < 1,500; 1,500 < +++).

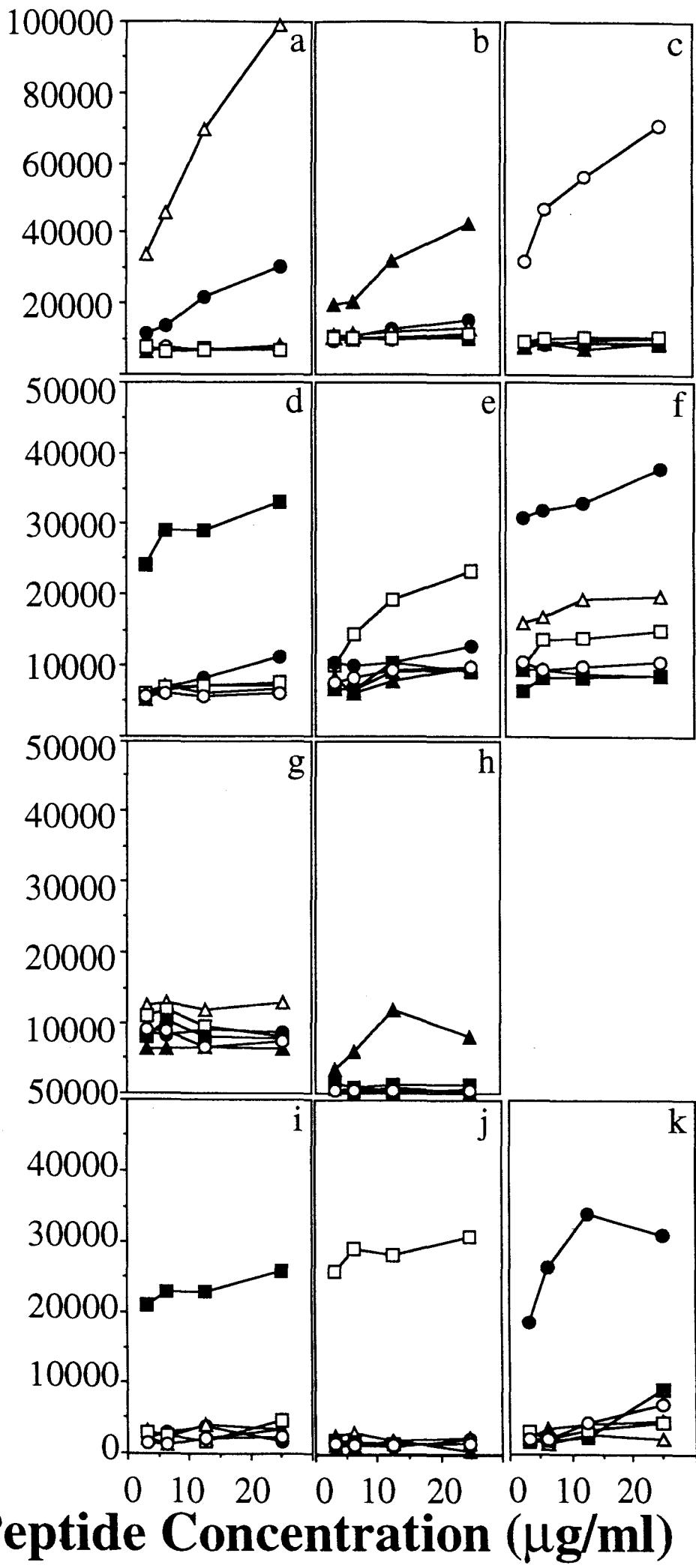
Table 3: V3 specific lymphokine secretions in mouse.

Spleen cells from CBA (H-2^k), C57bl/6 (H-2^b), Balb/c (H-2^d) mice immunized with the combinatorial peptide library were carried out for lymphokine secretions. T-cells were restimulated with the different synthetic peptides and supernatants were analyzed for IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, and IFN-γ cytokines (+ represents significant cytokine secretions).

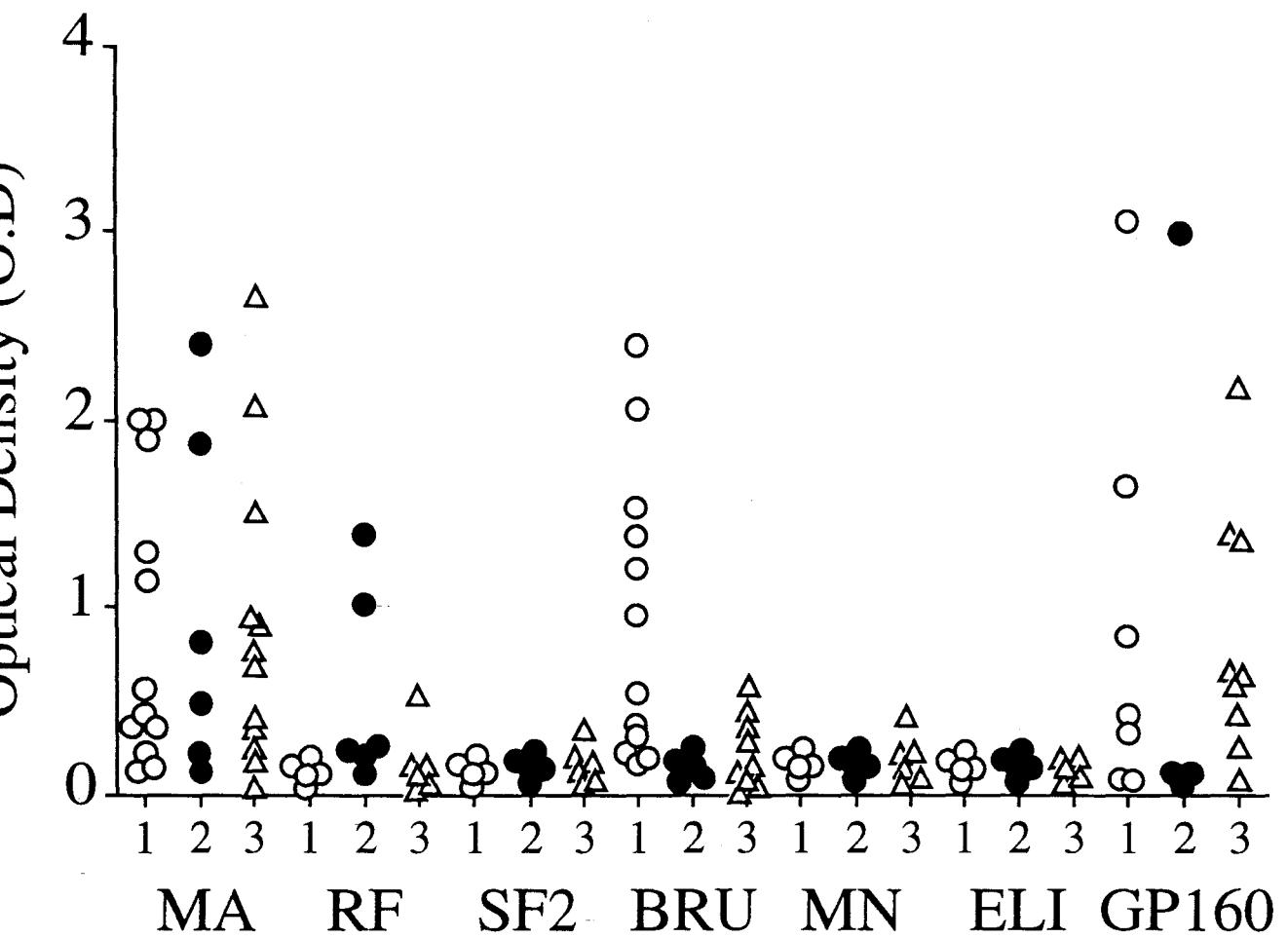
Divergence Scores

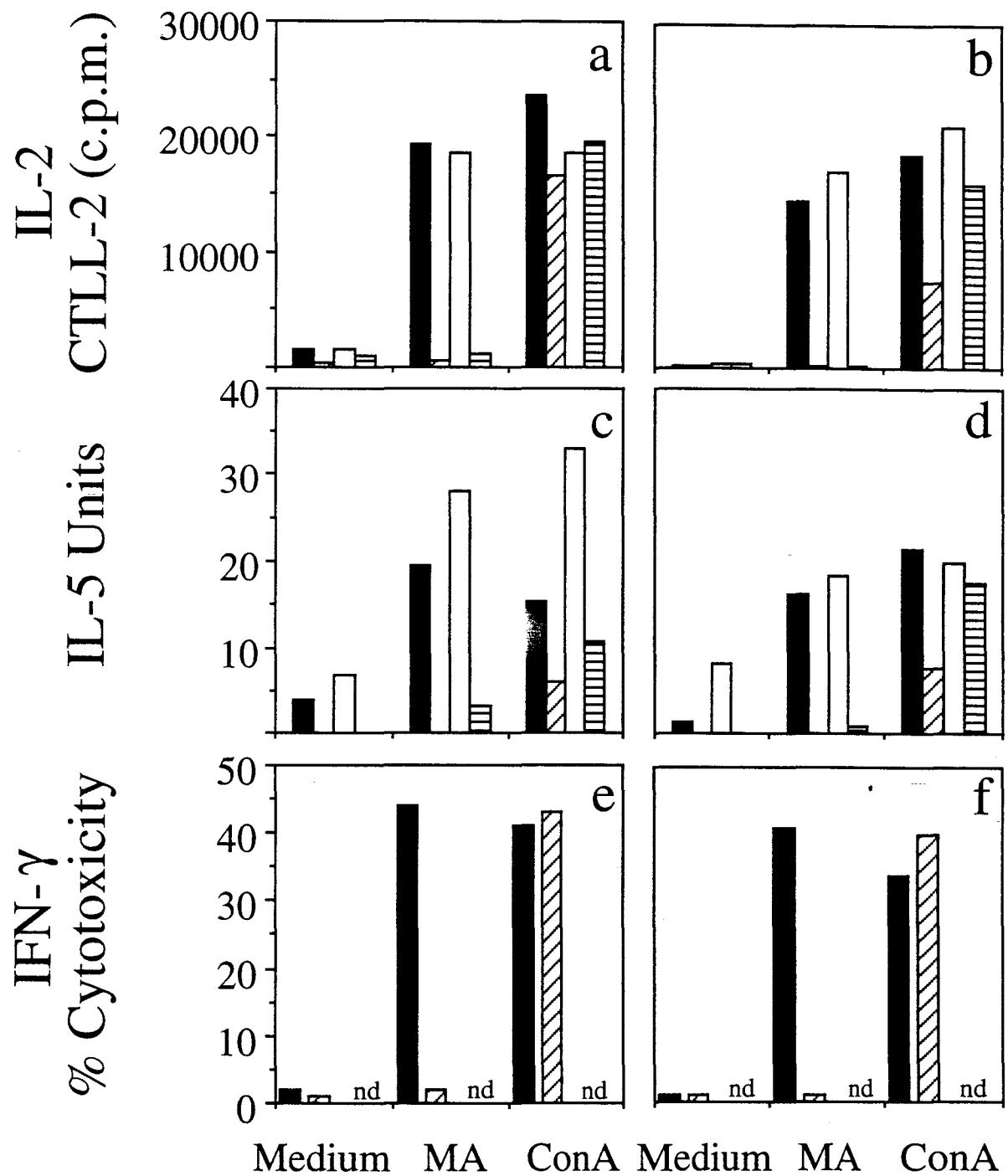
| | <i>BRU</i> | <i>RF</i> | <i>SF2</i> | <i>MN</i> | <i>ELI</i> |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>BRU</i> | 0 | 26.9 | 26.8 | 33 | 52.6 |
| <i>RF</i> | | 0 | 8.0 | 15.1 | 38.4 |
| <i>SF2</i> | | | 0 | 7.1 | 41.3 |
| <i>MN</i> | | | | 0 | 38.2 |

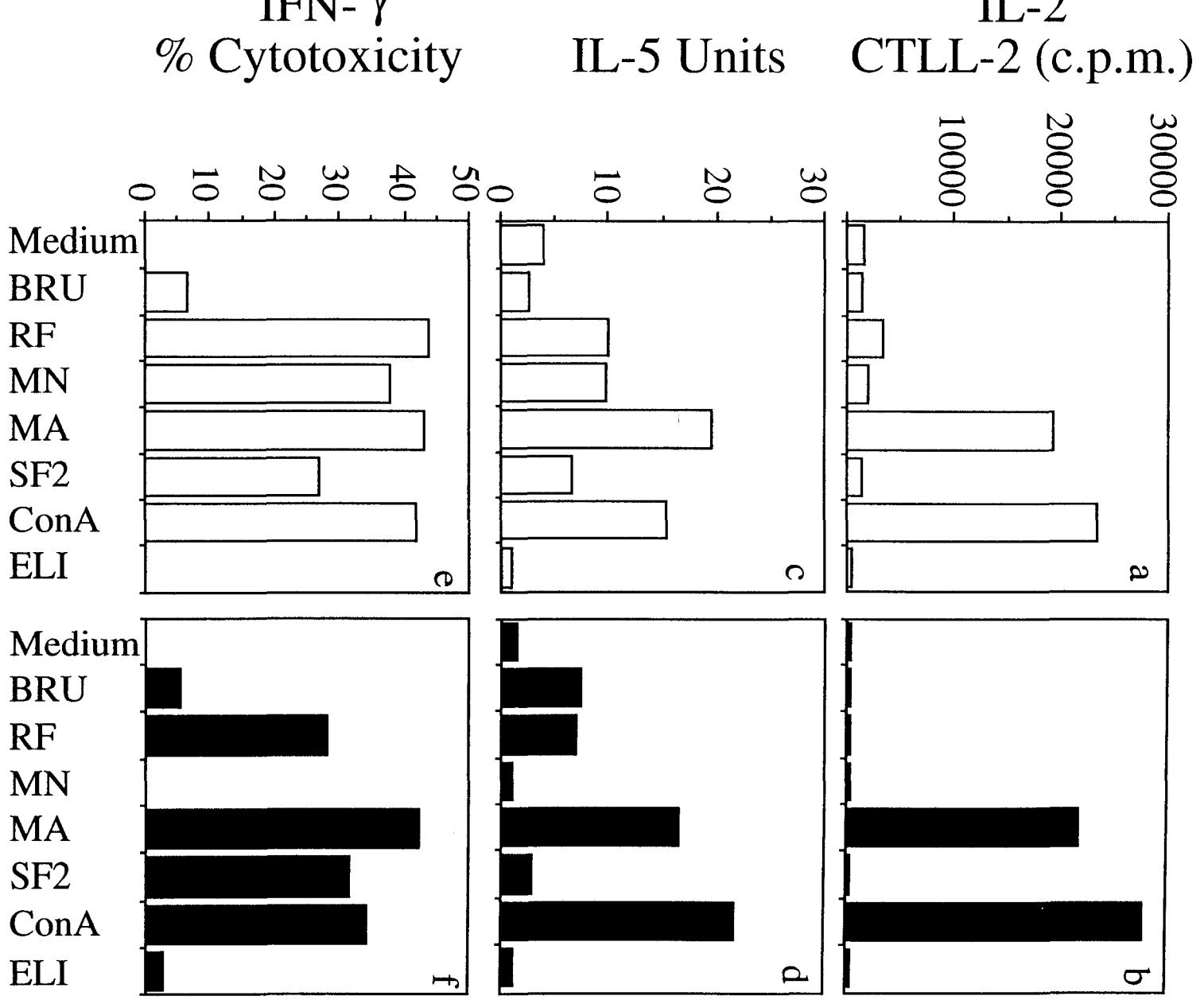
3H-TdR Incorporation (c.p.m.)



ANTIBODY RECOGNITION





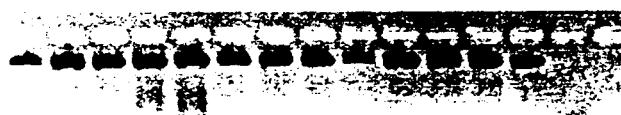


Lou M *Fischer*

CFA MA MA CFA

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 +
-- - - - - -

IFN- γ



β -actin

a b c d

IL-4



V3-specific cytokine secretions

| | MA | RF | SF2 | BRU | MN | ELI | Con A | |
|---------|------|----|-----|-----|----|-----|-------|---|
| CBA | IL-2 | + | + | - | + | + | - | + |
| | IL-3 | + | + | - | + | + | - | + |
| | IL-4 | - | - | - | - | - | - | + |
| | IL-5 | + | - | + | + | - | - | + |
| | IFN | + | - | - | + | + | - | + |
| C57bl/6 | IL-2 | + | + | + | + | + | - | + |
| | IL-3 | + | + | + | + | + | - | + |
| | IL-4 | - | - | - | - | - | - | + |
| | IL-5 | + | - | + | - | - | - | + |
| | IFN | + | - | + | + | + | - | + |
| Balb/c | IL-2 | + | - | + | - | - | - | + |
| | IL-3 | + | + | + | + | + | - | + |
| | IL-4 | - | - | - | - | - | - | + |
| | IL-5 | + | + | - | + | - | - | + |
| | IFN | + | - | + | - | - | - | + |

DISCUSSION

Les travaux relatifs à l'étude des peptides dérivés de la boucle V3, domaine hypervariable de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH (gp120), nous ont donc permis de souligner l'importance de cette séquence peptidique dans la génèse de la réponse immune, et par l'intermédiaire d'un mélange aussi complexe représenté par le mixotope, 750 000 séquences apparentées, de montrer toute la puissance de ce système immunitaire dans le choix opéré. Il faut noter que ces travaux aujourd'hui s'inscrivent dans un contexte plus général d'études faites sur la nature des peptides agonistes/antagonistes. Il faut rappeler que l'antigène, du moins un petit nombre d'acides aminés, présenté aux cellules T fait extrusion de la poche constituée par les deux hélices α et le plancher de feuillets β plissés. Ainsi, des différences aussi subtiles que la modification d'un seul acide aminé dans la séquence peut être à même de modifier la sensibilité de la cellule, par l'intermédiaire du complexe trimoléculaire formé par le peptide, la molécule de CMH et le récepteur T. Il faut souligner les très nombreux travaux effectués dans le passé pour distinguer les régions impliquées comme agrétope ou épitope.

Aujourd'hui, ces notions ont évolué grâce en particulier aux travaux du Prof. P. Allen et à son équipe, puisque cette mimicrie moléculaire conduit à une modification de la transduction des signaux se traduisant par la perte de prolifération et la mort de la cellule tout en conservant la capacité à sécréter certaines des cytokines et de voir leur profil évoluer. De plus, la réponse immune induite par le mixotope se fait en regard de séquences apparentées, constituant des familles et non une réponse généralisée vis-à-vis des 750 000 séquences, ce qui pourrait alors s'apparenter à une dégénérescence de la réponse immunitaire.

Quant à l'utilisation du mixotope en tant qu'agent vaccinant susceptible d'induire une réponse B neutralisante qui soit la plus large possible, celle-ci est en cours d'étude. Toutefois, au regard de la réponse cellulaire T, il faut souligner le caractère pluripotent de cette construction peptidique, capable d'induire une réponse spécifique quelque soit l'haplotype de l'animal immunisé. Par conséquent, il pourrait s'avérer être le prototype de futures constructions basées sur l'utilisation de synthèse combinatoire pour la génèse de "peptides" à visées vaccinales.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le 20^{ème} siècle a apporté avec lui la généralisation de la vaccination par l'intermédiaire de bacilles atténus ou tués, du génie génétique et la synthèse de protéines définies, et au cours de ces dix dernières années par la définition et la caractérisation des sites de reconnaissance des cellules B et T, afin d'utiliser ces séquences (peptides synthétiques) comme agent vaccinant. Au cours de cette même décennie, la structure des molécules de reconnaissance antigénique des cellules T (TCR) ou des cellules présentatrices (CMH), ainsi qu'associé à une meilleure connaissance des bases moléculaires de l'interaction entre peptide-molécule ont été définis.

Or, qu'en est-il de la compréhension des mécanismes physiologiques qui sous-tendent et interviennent dans la vaccination. Là, les réponses apparaissent des plus diverses, parfois contradictoires.

A ce jour, de grandes lignes directrices peuvent néanmoins être émises:

- **La voie** d'innoculation, soit systémique soit locale.
- **La nature de l'adjuvant**, soit en solution aqueuse, soit associé à de l'hydroxyde d'alumine ou à l'adjuvant de Freund.
- **La nature de l'antigène**, sous forme soit de protéine soluble soit de vecteurs recombinants (BCG, Adénovirus...).
- **La séquence antigénique** (antigène/agoniste/antagoniste).
- **La restriction génétique** de l'individu.

Ainsi, le chercheur soumet ce corps à ces différents ingrédients, le conditionnant et le conduisant vers une réponse immune qui sera éventuellement protectrice, parfois exacerbatrice de la maladie. En effet, ce corps qui sert de théâtre à cette lutte entre pathogène et organisme a également ses propres règles; règles qui sont aujourd'hui encore fort obscures. Le vaccin doit par conséquent mobiliser les forces de ce corps pour qu'il puisse se débarrasser de ces hôtes par le moyen de l'immunité.

Aujourd'hui, nous en sommes encore aux balbutiements, décrivant les relations entre réponse cellulaire et humorale, dictées, semble-t-il par une balance TH1/TH2 susceptible de protéger ou d'exacerber telles ou telles infections.

Ainsi, la quête en matière de vaccination n'est pas prête de s'essouffler et comme le dit Claude Bernard dans son "Introduction à l'étude de la médecine expérimentale":

Le désir ardent de la connaissance est l'unique mobile qui attire et soutient l'investigateur dans ses efforts; et c'est précisément cette connaissance qu'il saisit réellement et qui fuit cependant toujours devant lui, qui devient à la fois son seul tourment et son seul bonheur. Celui qui ne connaît pas les tourments de l'inconnu doit ignorer les joies de la découverte qui sont certainement les plus vives que l'esprit de l'homme puisse jamais ressentir. Mais, par un caprice de notre nature, cette joie de la découverte tant cherchée et tant espérée s'évanouit dès qu'elle est trouvée. Ce n'est qu'un éclair dont la lueur nous a découvert d'autres horizons

vers lesquels notre curiosité inassouvie se porte encore avec plus d'ardeur. C'est ce qui fait que dans la science même le connu perd son attrait, tandis que l'inconnu est toujours plein de charmes...

Claude Bernard, 1865.

FIGURES

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Le complexe CD3/TCR | 20 |
| d'après Sprent J., Fundamental Immunology, Paul, 2d eds, Raven Press. | |
| Organisation génomique codant pour les récepteurs $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ | 22 |
| d'après The Hand Book of Immunopharmacology, series editor: C. Page edited by M. Rola-Pleczynski. | |
| Molécules accessoires participant à l'interaction cellulaire des cellules T et B | 26 |
| d'après Clark E. et J. Ledbetter, Nature, 367:425, 1994. | |
| Structure tridimensionnelle des immunoglobulines (type IgG) | 31 |
| d'après Fundamental Immunology, Paul, 3rd eds, Raven Press. | |
| Modèle structural du récepteur des cellules B | 33 |
| d'après Cambier et al., Immunol.Rev. 132, 1993. | |
| Comparaison des récepteurs spécifiques des cellules T et B | 36 |
| d'après Immunol.Rev. 132, 1993. | |
| Organisation génomique du complexe majeur d'histocompatibilité; | 38 |
| Organisations des domaines des molécules de classe I et de classe II. | 38 |
| d'après R. Germain, Cell 76, 1994. | |
| Structure tridimensionnelle des molécules de classe I et II | 40 |
| d'après Hansen et al., Fundamental Immunology, Paul, 3rd eds, Raven Press. | |
| d'après Brown et al., Nature 364, 33, 1993. | |
| Représentation schématique de l'interaction cellulaire entre les cellules folliculaires dendritiques (FDC), les cellules B, et les cellules T au niveau des centres germinatifs. | 43 |
| d'après Koopman G. et S. Pals, Immunol. Rev. 126, 1992. | |
| Interaction moléculaire antigène-anticorps | 48 |
| d'après Hasemann C. et D. Capra, Fundamental Immunology, Paul, 2d eds, Raven Press. | |
| Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe I | 51 |
| d'après R. Germain, Cell 76, 1994. | |
| Présentation antigénique par les molécules de CMH de classe II | 53 |
| d'après R. Germain, Cell 76, 1994. | |
| Interaction moléculaire peptide-molécule de CMH | 56 |
| d'après Stern et al., Nature 368, 215, 1994. | |
| Molécules de classe I | 58 |
| d'après R. Germain, Cell 76, 1994. | |
| Molécules de classe II | 59 |
| d'après R. Germain, Cell 76, 1994. | |
| Reconnaissance peptidique | 60 |
| d'après Fundamental Immunology, Paul, 2d eds, Raven Press. | |
| Voie de la phospholipase C | 64 |
| document personnel | |
| Voie de la protéine kinase A | 67 |
| document personnel | |
| Signalisation intracellulaire | 70 |
| d'après Weiss A. et D. Littman, Cell, 76, 263, 1994. | |
| Propriétés structurales et fonctionnelles des cytokines | 73 |
| d'après Trinchieri Immunol. Today, 1994. | |
| Récepteur aux cytokines | 80 |
| d'après T. Kishimoto et al., Cell, 76, 1994. | |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|
| La particule virale | 84 |
| NIH publication, n°94-1536 | |
| Mécanisme de pénétration du virus VIH | 86 |
| d'après Fundamental Immunology, Paul, 3rd eds, Raven Press. | |
| Le génome virale | 89 |
| d'après Fauci, AIDS, 1992. | |
| Interaction moléculaire entre la molécule CD4 et la glycoprotéine GP120 | 92 |
| d'après Fundamental Immunology, Paul, 3rd eds, Raven Press. | |
| Syncitia viral | 99 |
| document personnel | |
| Cellules apoptotiques | 103 |
| document personnel | |

BIBLIOGRAPHIE

Principaux ouvrages:

Ligands, receptors, and signal transduction in regulation of lymphocyte function, 1990, Edited by J.C Cambier, ASM, Washington, D.C.

HLA: Fonctions immunitaires et applications médicales. 1994. Colombani J., Editions John Libbey Eurotext, Médecine/Sciences.

The cytokine hanbook. 1991. Edited by Thomson A., Harcourt Brace and Company publishers, Academic press inc.

Immunopharmacology of macrophages and other antigen-presenting-cells. 1994. Edited by Bruijnzeel-Kooen C. and Hoefsmit E., Harcourt Brace and Company publishers, Academic press inc.

- ALARCON, B., LEY, S.C., SANCHEZ-MADRID, F., BLUMBERG, R.S., TEJU, S., FRENSNO, M., TERHORST, C. 1991. The CD3- γ and CD3- δ subunits of the T cell antigen receptor can be expressed within distinct functional TCR/CD3 complexes. **EMBO J.**, **10**: 903.
- ALLEN, P.M. 1987. Antigen processing at the molecular level. **Immunol. Today**, **8**: 270-273.
- ALLEN, P.M., MATSUEDA, G., EVANS, R.J., DUNBAR, J.B., MARSHALL, G.R., UNANUE, E.R. 1987. Identification of the T-cell and Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope. **Nature**, **327**: 713-715.
- ALLISON, J.P. 1994. CD28-B7 interactions in T-cell activation. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 414-419.
- ALLISON, J.P., HAVRAN, W.L. 1991. The immunobiology of T cells with invariant $\gamma\delta$ receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, **9**: 679-705.
- ALZARI, P.M., LASCOMBE, M.B., POLJAK, R.J. 1988. Three dimensional structure of antibodies. **Annu. Rev. Immunol.**, **6**: 555-580.
- AMEISEN, J.C., CAPRON, A. 1991. T cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. **Immunol. Today**, **123**: 102-105.
- AMEISEN, J.C., GUY, B., CHAMARET, S., LOCHE, M., MACH, B., TARTAR, A., MOUTON, Y., CAPRON, A. 1989. Persistent antibody response to the HIV-1 negative regulatory factor in HIV-1 infected seronegative persons. **N. Engl. J. Med.**, **320**: 251.
- AMIT, A.G., MARIUZZA, R.A., PHILLIPS, S.E.V., POLJAK, R.J. 1986. The three dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. **Science**, **233**: 747-53.
- ANDERSON, M., MILLER, J.: 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 2282-2286.
- ANNAMARI, R., M. KROHN, J.P. ALLAIN, G. FRANCHINI, S.L. VALLE, J. ANTONEN, M. LEUTHER, K. KROHN. 1987. Long latency precedes overt seroconversion in sexually transmitted human-immunodeficiency-virus infection. **LANCET**,

- ARMITAGE, R.J. 1994. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 407-413.
- ARRIGO, A.P., TANAKA, K., GOLDBERG, A.L., WELCH, W.J. 1988. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). **Nature**, **331**: 192-194.
- ARUFFO, A., KANNER, S.B., SGROI, D., LEDBETTER, J.A., STAMENKOVIC, I. 1992. CD22-mediated stimulation of T cells regulates T-cell receptor/CD3-induced signalling. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 10242-10246.
- ASHWELL, J.D., KLAUSNER, R.D. 1990. Genetic and mutational analysis of the T cell antigen receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, **8**: 139-168.
- BABBITT, B., ALLEN, P., MATSUEDA, G., HABER, E., UNANUE, E. 1985. Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. **Nature**, **317**: 359-360.
- BAHRAOUI, E., M. YAGELLO, J.N. BILLAUD, J.M. SABATIER, B. GUY, E. MUCHMORE, M. GIRARD, J.C. GLUCKMAN. 1990. Immunogenicity of the human immunodeficiency virus (HIV) recombinant nef gene Product. Mapping of T-cell and B-cell epitopes in immunized chimpanzees. 1990. **AIDS Res. Human Retroviruses**, **6**: 1087-1098.
- BANDA, N.K., BERNIER, J., KURAHARA, D.K., KURRLE, R., HAIGWOOD, N., SEKALY, R.P., FINKEL, T.H. 1992. Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp 120 primes T cells for activation-induced apoptosis. **J. Exp. Med.**, **176**: 1099-1106.
- BANIYASH, M., GARCIA-MORALES, P., BONIFACIO, J.S., SAMELSON L.E., KLAUSNER, R.D. 1988. Disulfide linkage of the ζ and η chains of the T cell receptor. **J. Biol. Chem.**, **263**: 9874.
- BARBER, E.K., DASGUPTA, J.D., SCHLOSSMAN, S.F., TREVILLYAN, J.M., RUDD, C.E. 1989. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56^{Ick}) that phosphorylates the CD3 complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**:3277.

- BARRE-SINOUSSI, F., CHERMANN, J.C., REY, F., MONTAGNIER, L. 1983. Isolation of a T- lymphotropic retrovirus from a patient a risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, **220**: 868-872.
- BELL, E.B. 1992. Function of CD4 T cell subsets *in vivo*: expression of CD45R isoforms. **Semin. Immunol.**, **4**: 43-50.
- BENACERRAF, B., McDEVITT, H.O. 1972. Histocompatibility-linked immune response genes. **Science**, **175**: 273-279.
- BENDINELLI, M., CECCHERINI-NELLY, L. 1988. Mechanisms of retrovirus pathogenicity. **Clin. Immunol.**, **9**: 57-66.
- BERRIDGE, M.J., IRVINE, R.F. 1989. Inositol phosphates and cell signaling. **Nature**, **341**: 197.
- BERTOLINO, P., FORQUET, F., PONT, S., KOCH, N., GERLIER, D., RABOURDIN-COMBE, C. 1991. Correlation between invariant chain expression level and capability to present antigen to MHC class II restricted T cells. **Int. Immunol.**, **3**: 435-443.
- BERZOFSKY, J.A. 1985. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. **SCIENCE**, **229**: 932-940.
- BERZOFSKY, J.A., CEASE, K.B., CORNETTE, J.L., SPOUGE, J.L., MARGALIT, H., BERKOWER, I.J., GOOD, M.F., MILLER, L.H., DeLISI C. 1987. Protein antigenic structures recognized by T cells: potential application to vaccine design. **Immunol. Rev.**, **98**: 9-52.
- BERZOFSKY, J.A., K.B. CEASE, J.L. CORNETTE, J.L. SPOUGE, H. MARGALIT, I.J. BERKOWER, M.F. GOOD, L.H. MILLER, C. DELISI. Protein antigenic structures recognized by T cells: Potential applications to vaccine design. 1987. **Immunol. Rev.**, **98**: 9-51.
- BEYERS, A.D., SPRUYT, L.L., WILLIAMS, A.F. 1992. Molecular associations between the T-Lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 2945-2949.
- BIERER, B.E., HAHN, W.C. 1993. T cell adhesion, avidity regulation and signaling: A molecular analysis of CD2. **Semin. Immunol.**, **5**: 249-261.

- BIERER, B.E., SLECKMAN, B.P., RATNOFSKY, S.E., BURAKOFF, S.J. 1989. The biological roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, **7**: 579.
- BIRBECK, M.S., BREATHNACH, A.S., EVERALL, J.D. 1961. An ultrastructural study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. **J. Invest. Dermatol.**, **37**: 51-64.
- BJORKMAN, P.J., PARHAM, P. 1991. Structure, function and diversity of class I major histocompatibility molecules. **Annu. Rev. Biochem.**, **59**: 253-286.
- BJORKMAN, P.J., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BENNETT, W.S., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen HLA-A2. **Nature**, **329**: 506-511.
- BJORKMAN, P.J., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1985. Crystallization and X-ray diffraction studies on the histocompatibility antigens HLA-A2 and HLA-A28 from human cell membranes. **J. Mol. Biol.**, **186**: 205-210.
- BONYHADI, M.L., RABIN, L., SALIMI, S., BROWN, D.A., KOSEK, J., McCUNE, J.M., KANESHIMA, H. 1993. HIV induces thymus depletion in vivo. **Nature**, **363**: 728-732.
- BOTTOMLY, K. A functional dichotomy in CD4⁺ T lymphocytes. 1988. **Immunol. Today**, **9**: 268-273.
- BOURNE, H.R., LICHTESTEIN, L.M., MELMON, K.L., HENNEY, C.S., WEINSTEIN, Y., SHEARER, G.M. 1974. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. **Science**, **184**: 19.
- BRADLEY, L.M., CROFT, M., SWAIN, S.L. 1993. T cell memory: new perspectives. **Immunol. Today**, **14**: 197-199.
- BRENNER, M.B., STROMINGER, J.L., KRANGEL, M.S. 1988. The $\gamma\delta$ T cell receptor. **Adv. Immunol.**, **43**: 133.
- BRODSKY, F.M., GUAGLIARDI, L.E. 1991. The cell biology of antigen processing and presentation. **Annu. Rev. Immunol.**, **9**: 707-44.
- BROWN, D. 1993. The tyrosine kinase connection: how GPI-anchored proteins activate T cells. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 349-354.

- BROWN, J., JARDETZKY, T., GORGA, J., STERN, L., URBAN, R., STROMINGER, J., WILEY, D. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. **Nature**, **364**: 33-39.
- BROWN, J.H., JARDETZKY, T.S., SAPER, M.A., SAMRAOUI, B., BJORKMAN, P.J., WILEY, D.C. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. **Nature**, **332**: 845-849.
- BUUS, S., A. SETTE, S.M. COLON, G. MILES, H.M. GREY. The relation between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. 1987. **235**: 1353-1358.
- BUUS, S., SETTE, A., GREY, H.M. 1987. The interaction between protein derived immunogenic peptides and Ia. **Immunol. Rev.**, **98**: 115-142.
- CAMBIER, J.C., BEDZYK, W., CAMPBELL, K., CHIEN, N., FRIEDRICH, J., HARWOOD, A., JENSEN, W., PLEIMAN, C., CLARK, M.R. 1993. The B-cell antigen receptor: Structure and function of primary, secondary, tertiary and quaternary components. **Immunological Rev.**, **132**: 85-106.
- CANTRELL, D. 1994. G proteins in lymphocyte signalling. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 380-384.
- CARRENO, B.M., WINTER, C.C., TAUROG, J.D., HANSEN, T.H., BIDDISON, W.E. 1993. Residues in pockets B and F of HLA-B27 are critical in the presentation of an influenza A virus nucleoprotein peptide and influence the stability of peptide-MHC complexes. **Int. Immunol.**, **5**: 353-360.
- CHEN, B.P., PARHAM, P. 1989. Direct binding of influenza peptides to class I HLA molecules. **Nature**, **337**: 743-744.
- CHENG-MAYER, C., SETO, D., TATENO, M., LEVY, J.A. 1988. Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. **Science**, **240**: 80.
- CHICZ, R.M., URBAN, R.G., GORGA, J.C., VIGNALI, D.A.A., LANE, W.S., STROMINGER, J.L. 1993. Specificity and promiscuity among

naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. **J. Exp. Med.**, **178: 27-47.**

- CHICZ, R.M., URBAN, R.G., LANE, W.S., GORGA, J.C., STERN, L.J., VIGNALI, D.A.A., STROMINGER, J.L. 1992. Predominant naturally processed, peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. **Nature**, **358: 764-768.**
- CLARK, M.R., CAMPBELL, K.S., KAZLAUSKAS, A., JOHNSON, S.A., HERTZ, M., POTTER, T.A., PLEIMAN, C., CAMBIER, J.C. 1992. The B cell antigen receptor complex: association of Ig- α and Ig- β with distinct cytoplasmic effectors. **Science**, **258: 123-126.**
- CLERICI, M., D.R. LUCEY, J.A. BERZOFSKY, L.A. PINTO, T.A. WYNN, S.P. BLATT, M.J. DOLAN, C.W. HENDRIX, S.F. WOLF, G.M. SHEARER. 1993. Restoration of HIV-specific cell mediated immune response by IL-12 *in vitro*. **SCIENCE**, **262: 1721-1724.**
- CLERICI, M., SHEARER, G.M. 1993. A TH1-TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. **Immunol. Today**, **14: 107-111.**
- CLERICI, M., T.A. WYNN, J.A. BERZOFSKY, S.P. BLATT, C.W. HENDRIX, A. SHER, R.L. COFFMAN, G.M. SHEARER. 1994. Role of IL-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with HIV. **J. Clin. Invest.**, **93: 768- 775.**
- CLEVERS, H., ALARCON, B., WILLEMAN, T., TERHORST, C. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. **Annu. Rev. Immunol.**, **6: 629.**
- CLEVERS, H.C., OWEN, M.J. 1991. Towards a molecular understanding of T-cell differentiation. **Immunol. Today**, **12: 86-92.**
- COHEN, E.A., DEHNI, G., SODROSKI, J.G., HASELTINE, W.A. 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. **J. Virol.**, **64: 3097-3099.**
- COHEN, J.J. 1993. Apoptosis. **Immunol. Today**, **14: 126-130.**
- COLLINS, T.L., UNIYAL, S., SHIN, J., STROMINGER, J.L., MITTLER, R.S., BURAKOFF, S.J. 1992. p56^{lck} association with CD4 is

required for the interaction between CD4 and the TCR/CD3 complex and for optimal antigen stimulation. **J. Immunol.**, **148**: 2159-2162.

- COX, J.H., YEWDELL, J.W., EISENLOHR, L.C., JOHNSON, P.R., BENNINK, J.R. 1990. Antigen presentation requires transport of MHC class I molecules from the endoplasmic reticulum. **Science**, **247**: 715-717.
- CRABTREE, G.R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. **Science**, **243**: 355-361.
- CRISE, B., ROSE, J.K., 1992. Human immunodeficiency virus type 1 precursor retains a CD4-p56^{ck} complex in the endoplasmic reticulum. **J. Virol.**, **66**: 2296.
- CULLEN, B.R. 1991. Regulation of human immunodeficiency virus replication. **Annu. Rev. Microbiol.**, **45**: 219-250.
- CULLEN, B.R., GREENE, W.C. 1989. Regulatory pathways governing HIV-1 replication. **Cell**, **58**: 423.
- CULMANN, B., E. GOMARD, M.P. KIÉNI, B. GUY, DREYFUS, F., A.G. SAIMOT, D. SERENI, D. SICARD, J.P. LÉVY. 1991. Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8⁺ T cells in the central region of the HIV-1 nef protein. **J. Immunol.**, **146**: 1560-1565.
- D'ANDREA, A.D., ASTE-AMEZAGA, M., VALAINTE, N.M., MA, X., KUBIN, M., TRINCHIERI, G. 1993. Interleukin-10 inhibits lymphocyte IFN- γ production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 synthesis in accessory cells. **J. Exp. Med.**, **178**: 1041-1048.
- DALGLEISH, A.G., BEVERLEY, P.C.L., CLAPHAM, P.R., CRAWFORD, D.H., GREAVES, M.F., WEISS R.A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS virus. **Nature**, **312**:763.
- DAMJANOVICH, S., SZOLLOSI, J., TRON, L. 1992. Transmembrane signalling in T cells. **Immunol. Today**, **13**: 12-15.
- DANIEL, M.D., LETVIN, N.L., KING, N.W., KANNAGI, M., SEHGAL, P.K., HUNT, R.D., KANKI, P.J., ESSEX, M. 1985. Isolation of a T-cell tropic HTLV-III- like retrovirus from macaques. **Science**, **228**: 1201-1204.

- 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**.
- DAUSSET, J., PLA, M. Complex Majeur d'Histocompatibilité de l'homme. Paris: Flammarion 1989.
- DAVIS, G.B., MITCHELL, D.J., WRAITH, D.C., TODD, J.A., ZAMVIL, S.C., McDEVITT, H.O., STEINMAN, L., JONES, P. 1989. Polymorphic residues on the I-A β chain modulate the stimulation of T cell clones specific for the N-terminal peptide of the autoantigen myelin basic protein. **J. Immunol.**, **143**: **2083-2093**.
- DAVIS, M.M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. **Annu. Rev. Biochem.**, **59**: **475-496**.
- DAVIS, M.M., BJORKMAN, P.J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, **334**: **395-402**.
- DE JONG, J.J., DE RONDE, A., KEULEN, W., TERSMETTE, M., GOUDSMIT, J. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: Analysis by single amino acid substitution. **J. Virol.**, **66**: **6777-6780**.
- DE PANTIFILIS, G., MANARA, G.C., FERRARI, C and TORRESANI, C. 1991. Adhesion molecules on the plasma membrane of epidermal cells. Keratinocytes and Langerhans cells constitutively express the lymphocyte function-associated antigen 3. **J. Invest. Dermatol.** **96**: **512**
- DEGEN, E., COHEN-DOYLE, M.F., WILLIAMS, D.B. 1992. Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both β_2 -microglobulin and peptide. **J. Exp. Med.**, **175**: **1653-1661**.
- DEL LIANO, A.M., AMIEIRO-PUIG, J.P., KRAISELBURD, E.N., KESSLER, M.J., MALAGA, C.A., LAVERGNE, J.A. 1993. The combined assessment of cellular apoptosis, mitochondrial function and proliferative response to pokeweed mitogen has prognostic value in SIV infection. **J. Med. Primatol.**, **22**: **194-200**.

- DEMOTZ, S., GREY, H.M., SETTE, A. 1990. The minimal number of class II MHC-antigen complexes needed for T cell activation. **Science**, **249**: **1028-1030**.
- DEVERSON, E.V., GOW, I.R., COADWELL, W.J., MONACO, J.J., BUTCHER, G.W. 1990. MHC class II region encoding proteins related to the multidrug resistance family of transmembrane transporters. **Nature**, **348**: **738**.
- DO, A., HAMILTON, T.A. 1984. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, **2**: **283-318**.
- EDELMAN, A.S., ZOLLA-PAZNER, S. 1989. AIDS: a syndrome of immune dysregulation, dysfunction and deficiency. **FASEB J.**, **3**: **22-30**.
- EGERTON, M., SCOLLAY, R., SHORTMAN, K. 1990. The kinetics of mature T cell development in the thymus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: **2579-2582**.
- ELLIOTT, T. 1991. How do peptides associate with MHC class I molecules? **Immunol. Today**, **12**: **386-388**.
- EMBERTSON, J., ZUPANCIC, M., RIBAS, J.L., BURKE, A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., HAASE, A.T. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.
- ENGELHARD, V.H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. **Annu. Rev. Immunol.**, **12**: **181-207**.
- ENGLER, P., STORB, U. 1988. Immunoglobulin gene rearrangement. In: **Genetic Recombination**, eds. Kucherlapati, R., Smith, G.R., pp:667-700. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- FALK, K., ROTZSCHKE, O., DERES, K., METZGER, J., JUNG, G., RAMMENSEE, H.G. 1991. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T-cell epitope forecast. **J. Exp. Med.**, **174**:**425-34**.
- FALK, K., ROTZSCHKE, O., RAMMENSEE, H.G. 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class-I molecules. **Nature**, **348**: **248-251**.

- FALK, K., ROTZSCHKE, O., STEVANOVIC, S., JUNG, G., RAMMENSEE, H.G. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. **Nature**, **351**: 290-296.
- FANTINI, J., COOK, D.G., NATHANSON, N., SPITALNIK, S.L., GONZALES-SCARANO, F. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 2700.
- FAUCI, A.S. 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, **239**: 617-622.
- FEARON, D.T. 1993. The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 341-348.
- FINKEL, T.H., KUBO, R.T., CAMBIER, J.C. 1991. T-cell development and transmembrane signalling: changing biological responses through an unchanging receptor. **Immunol. Today**, **12**: 79-85.
- FIORENTINO, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell. - IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, **170**: 2081-2095.
- 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. **Science**, **243**: 919-22.
- FRANKEL, A.D., BREDT, D.S., PABO, C.O. 1988. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. **Science**, **240**: 70.
- FRANKEL, A.D., PABO, C.O. 1988. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, **55**: 1189.
- FREMONT, D.H., MATSUMURA, M., STURA, E.A., PETERSON, P.A., WILSON, I.A. 1992. Crystal structures of 2 viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K^b. **Science**, **257**: 919-26.

- FULTZ, P.N., McCLURE, H.M., SWENSON, R.B., McGRATH, C.R., BRODIE, A., GETCHELL, J.P. 1986. Persistent infection of chimpanzees with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. A potential model for acquired immunodeficiency syndrome. **J. Virol.**, **1986:** **116-124.**
- GALLO, R.C., SARIN, P.S., GELMANN, E.P. 1983. Isolation of human T-cell leukemia-lymphoma syndrome (AIDS). **Science**, **20:** **865-7-9.**
- GARRETT, T.P.J., SAPER, M.A., BJORKMAN, P.J., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. **Nature**, **342:** **692-695.**
- GERDERBLOM, H.R., HAUSMANN, E.H., OZEL, M., PAULI, G., KOCH, M.A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. **Virology**, **156:171.**
- GERMAIN, R.N. 1986. The ins and outs of antigen processing and presentation. **Nature**, **322:** **687-689.**
- GERMAIN, R.N. 1991. Antigen presentation: the second class story. **Nature**, **353:** **605-607.**
- GERMAIN, R.N., HENDRIX, L.R. 1991. MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. **Nature**, **353:** **134-9.**
- GEYSEN, H.M. 1985. Antigen-antibody interactions at the molecular level: adventures in peptide synthesis. **Immunol. Today**, **6:** **364.**
- GILMAN, A.G. 1987. G-proteins. Transducers of receptor-generated signals. **Annu. Rev. Biochem.**, **56:** **615.**
- 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:** **3725-3730.**
- GLAICHENHAUS, N., SHASTRI, N., LITTMAN, D.R., TURNER, J.M. 1991. Requirement for association of p56^{lck} with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells. **Cell**, **64:** **511-520.**
- GLYNNE, R., POWIS, S.H., BECK, S., KELLY, A., KERR, L.A., TROWSDALE, J. 1991. A proteasome-related gene between the two ABC

transporter loci in the class II region of the human MHC. **Nature**, **353**: **357-60**.

- GOLDBERG, A.L., ROCK, K.L. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. **Nature**, **357**: **375-379**.
- GOLDSTEIN, P., OJCIUS, D.M., YOUNG, J.D.E. 1991. Cell death mechanism and the immune system. **Immunol. Rev.**, **121**: **29-65**.
- GOUDSMIT, J., NARA, P. 1991. Understanding the role of the V3 domain in the pathogenesis of AIDS. **6th colloque des Cent Gardes, Marnes-La-Coquette**.
- GOUGEON, M.L., GARCIA, S., HEENEY, J., TSCHOPP, R., LECOEUR, H., GUETARD, D., RAME, V., DAUGUET, C., MONTAGNIER, L. 1993. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **9**: **553-563**.
- GRAVELL, M., LONDON, W.T., HAMILTON, R.S., S.G., M. MONZON. 1989. Infection of macaque monkeys with simian immunodeficiency virus from african green monkeys: virulence and activation of latent infection. **J. Med. Primatol.**, **18**: **247-254**.
- GRAZIOSI, C., G. PANTALEO, K.R. GANTT, J.P. FORTIN, J.F. DEMAREST, O.J. COHEN, R. SÉKALI, A.S. FAUCI. 1994. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. **SCIENCE**, **265**: **248-252**.
- GROUX, H., TORPIER, G., MONTE, D., MOUTON, Y., CAPRON, A., AMEISEN, J.C. 1992. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. **J. Exp. Med.**, **175**: **331-340**.
- GUAGLIARDI, L.E., KOPPELMAN, B., BLUM, J.S., MARKS, M.S., CRESSWELL, P., BRODSKY, F.M. 1990. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. **Nature**, **343**: **133-139**.
- GUILLEMETTE, G., 1989. Messagers intracellulaires produits par la phospholipase C. **Médecine/sciences**, **5**: **570**.
- GUO, H.C., JARDETZKY, T.S., GARETT, T.P.J., LANE, W.S., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1992. Different length peptides bind to

HLA-Aw68 similary at their ends but bulge out in the middle. **Nature**, **360**: **364-367**.

- GUO, H.C., MADDEN, D.R., SILVER, M.L., JARDETZKY, T.S., GORGA, J.C., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1993. Comparison of the P2 specificity pocket in three human histocompatibility antigens: HLA-A* 6801, HLA-A*0201, and HLA-B*2705. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: **8053-8057**.
- HAAS, W., PEREIRA, P., TONEGAWA, S. 1993. Gamma/Delta cells. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: **637-685**.
- HABESHAW, J., HOUNSELL, E., DALGLEISH, A. 1992. Does the HIV envelope induce a chronic graft-versus-host-like disease? **Immunol. Today**, **13**: **207-210**.
- HABESHAW, J.A., DALGLEISH, A.G., BOUNTIFF, L., NEWELL, A.L., WILKS, D., WALKER, L.C., MANCA, F. 1990. AIDS pathogenesis: HIV envelope and its interaction with cell proteins. **Immunol. Today**, **11**: **418**.
- HALL, A. 1990. The cellular functions of small GTP-binding proteins. **Science**, **249**: **635-640**.
- HAMMER, J., VALSASNINI, P., TOLBA, K., BOLIN, D., HIGELIN, J., TAKACS, B., SINIGAGLIA, F. 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides. **Cell**, **74**: **197-203**.
- HAMMERLING, G.J., MORENO, J. 1990. The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class-II molecules. **Immunol. Today**, **11**: **337-339**.
- HARDING, C.V., ROOF, R.W., ALLEN, P.M., UNANUE, E.R. 1991. Effects of pH and polysaccharides on peptide binding to class-II major histocompatibility complex molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: **2740-2744**.
- HARDING, C.V., UNANUE, E.R. 1990. Quantitation of antigen-presenting cell MHC class II/peptide complexes necessary for T-cell stimulation. **Nature**, **346**: **574-576**.
- HASELTINE, W.A. 1991. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. **FASEB J.**, **5**: **2349**.

- HAVRAN, W.L., BOISMENU, R. 1994. Activation and function of $\gamma\delta$ T cells. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 442-446.
- HEDRICH, S.M., *et al.* 1984. Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane associated proteins. **Nature**, **308**: 149-153.
- HEINEN, E., CORMANN, N., LESAGE, F., KINET-DENOEL, C., TSUNODA, R., SIMAR, L.J. 1988. Follicular dendritic cells as accessory cells. In: **Antigen Cells Diversity, Differentiation, and Regulation**, eds. Schook, L.B., TEW, J.G., ALAN, R. Liss Inc., N.Y. p:69.
- HILL, C.M., HAYBALL, J.D., ALLISON, A.A., ROTHBARD, J.B. 1991. Conformational and structural characteristics of peptides binding to HLA-DR molecules. **J. Immunol.**, **147**: 189-97.
- HIRSCH, V., OLMSTED, R.A., MURPHEY-CORB, M., PURCELL, R.H., JOHNSON, P.R. 1989. An african primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature**, **339**: 389-392.
- HOGG, N. 1989. The leukocyte integrins. **Immunol. Today**, **10**: 111-114.
- HOKIN, M.R., HOKIN, L.E. 1953. Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipids of pancreas slices. **J. Biol. Chem.**, **203**: 967.
- HOLLENBAUGH, D., GROSMIRE, L., KULLAS, C., CHALUPNY, N., BRAESCH-ANDERSEN, S., NOELLE, R., STAMENKOVIC, I., LEDBETTER, J., ARUFFO, A. 1992. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: Expression of a soluble form of gp39 with B cell costimulatory activity. **EMBO J.**, **11**: 4313-4321.
- HONJO, T. 1983. Immunoglobulin genes. **Annu. Rev. Immunol.**, **1**: 499.
- HOVANESSIAN, A.G. 1992. On the HIV nef gene product. **Res. Virol.**, **143**: 31-81.
- HUNKAPILLER, T., HOOD, L. 1989. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. **Adv. Immunol.**, **44**: 1-64.

- HUNT, D.F., HENDERSON, R.A., SHABANOWITZ, J., SAKAGUCHI, K., MICHEL, H., SEVILIR, N., COX, A.L., APPELLA, E., ENGELHARD, V.H. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. **Science**, **255**: 1261-3.
- HUNT, D.F., MICHEL, H., DICKINSON, T.A., SHABANOWITZ, J., COX, A., SAKAGUCHI, K., APPELLA, E., GREY, H.M., SETTE, A. 1992. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A^d. **Science**, **256**: 1817-1820.
- ISAKOV, N. 1993. Tyrosine phosphorylation and dephosphorylation in T lymphocyte activation. **Molecular Immunol.**, **30**: 197-210.
- JANEWAY, C.A. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. **Annu. Rev. Immunol.**, **10**: 645-674.
- JANEWAY, C.A., GOLSTEIN, P. 1993. Lymphocyte activation and effector functions. Editorial overview. The role of cell surface molecules. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 313-323.
- JARDETSKY, T.S., GORGA, J.C., BUSCH, R., ROTHBARD, J., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1990. Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. **EMBO J.**, **9**: 1797-804.
- JARDETSKY, T.S., LANE, W.S., ROBINSON, R.A., MADDEN, D.R., WILEY, D.C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. **Nature**, **353**: 326-329.
- JEANG, K.T., CHANG, Y.N., BERKHOUT, B., HAMMARSkjold, M.L., REKOSH, D. 1991. Regulation of HIV expression: mechanisms of action of Tat and Rev. **AIDS**, **5**: S3-S14.
- JENKINS, M.K., BURREL, E., ASHWELL, J.D. 1990. Antigen presentation by resting B cells. Effectiveness at inducing T cell proliferation is determined by costimulatory signals, not T cell receptor occupancy. **J. Immunol.**, **144**: 1585.
- JENKINS, M.K., JOHNSON, J.G. 1993. Molecules involved in T-cell costimulation. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 361-367.

- JENSEN, P.E. 1990. Regulation of antigen presentation by acidic pH. *J. Exp. Med.*, **171**: 1779-1784.
- JIN, Y.J., CLAYTON L.K., HOWARD, F.D., KOYASU, S., SIEH, M., STEINBRICH, R., TARR, G.E., REINHERZ, L. 1990. Molecular cloning of the CD3 η subunit identifies a CD3 ζ -related product in thymus-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 3319.
- JORDAN, C., WATKINS, B., KUFTA, C., and DUBOIS- DALCQ, M. 1991. Infection of brain microglial cells by human immuno-deficiency virus type 1 is CD4 dependant. *J. Virol.*, **65**: 736-742.
- JOYCE, S., NATHENSON, S.G. 1994. Methods to study peptides associated with MHC class I molecules. *Current Opinion Immunol.*, **6**: 24-31.
- JUNE, C.H., LEDBETTER, J.A., LINSLEY, P.S., THOMPSON, C.B. 1990. Role of the CD28 receptor in T cell activation. *Immunol. Today*, **11**: 211-216.
- KAUFMAN, J.F., AUFRAY, C., KORMAN, A.J., SHACKELFORD, D.A., STROMINGER, J.L. 1984. The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex. *Cell*, **36**: 1-13.
- KELLY, A., POWIS, S.H., GLYNNE, R., RADLEY, E., BECK, S., TROWSDALE, J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature*, **353**: 667-668.
- KELLY, A., POWIS, S.H., KERR, L.A., MOCKRIDGE, I., ELLIOTT, T., BASTIN, J., UCHANSKA-ZIEGLER, B., ZIEGLER, A., TROWSDALE, J., TOWNSEND, A. 1992. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature*, **355**: 641-644.
- KELSOE, G., ZHENG, B. 1993. Sites of B-cell activation in vivo. *Current Opinion Immunol.*, **5**: 418-422.
- KESTLER III, H.W., RINGLER, D.J., MORI, K., PANICALLI, D., SEHGAL, P., DANIEL, M.D., DESROSIERS R.C. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell*, **65**: 651-662.

- KING, P.D., KATZ, D.R. 1990. Mechanisms of dendritic cell function. *Immunol. Today*, **11**: 206-210.
- KIPPS, T.J. 1989. The CD5 B cell. *Adv. Immunol.*, **47**: 117-185.
- KLATZMANN, D., BARRE-SINOUESSI, F., NUGUYERE, M.T., DANQUET, C., VILMER, E., GRISCELLI, C., BRUN-VEZINET, F., ROUZIOUX, C., GLUCKMAN, J.C., CHERMANN, J.C., MONTAGNIER, L. 1984. Selective tropism of LAV for helper-inducer T lymphocytes. *Science*, **225**: 59.
- KLAUS, G.G.B., HUMPHREY, J.H., KUNKL, A., DONGWORTH, D.W. 1980. The follicular dendritic cell: Its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunological Rev.*, **53**: 3.
- KLEIJMEER, M.J., KELLY, A., GEUZE, H.J., SLOT, J.W., TOWNSEND, A., TROWSDALE, J. 1992. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature*, **357**: 342-344.
- KLEIN, J. 1979. The major histocompatibility complex of the mouse. *Science*, **203**: 516-521.
- KLINMAN, N.R. 1994. Selection in the expression of functionally distinct B-cell subsets. *Current Opinion Immunol.*, **6**: 420-424.
- KNIGHT, S.C., STAGG, A.J. 1993. Antigen-presenting cell types. *Current Opinion Immunol.*, **5**: 374-382.
- KOBAYASHI, M., FITZ, L., RYAN, M., HEWICK, R.M., CLARK, S.C., CHAN, S., LOUDON, R., SHERMAN, F., PERUSSIA, B., TRINCHIERI, G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **170**: 827-845.
- KOCH, C.A., ANDERSON, D., MORAN, M.F., ELLIS, C., PAWSON, T. 1991. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252**: 668.
- KONIG, R., HUANG, L-Y, GERMAIN, R.N. 1992. MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature*, **356**: 796-799.

- KOPELMAN, R.G., ZOLLA-PAZNER, S. 1988. Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am. J. Med.*, **84**: 82-88.
- KOPPELMAN, B., ZIMMERMAN, D.L., WALTER, P., BRODSKY, F.M. 1992. Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3908-3912.
- KOSCO, M.H., GRAY, D. 1992. Signals involved in germinal center reactions. *Immunological Rev.*, **126**: 64-76.
- KOURILSKY, P., CLAVERIE, J.M. 1986. The peptide self model: a hypothesis on the molecular nature of the immunological self. *Annu. Inst. Pasteur, Immunol.*, **137D**, 3.
- KOZLOWSKI, S., TAKESHITA, T., BOEHNCKE, W-H., TAKAHASHI, H., BOYD, L.F., GERMAIN, R.N., BERZOFSKY, J.A., MARGULIES, D.H. 1991. Excess β_2 microglobulin promoting functional peptide association with purified soluble class I MHC molecules. *Nature*, **349**: 74.
- KRIEGER, J.I., GRAMMER, S.F., GREY, H.M., CHESTNUT, R.W. 1985. Antigen presentation by splenic B cells: resting B cells are ineffective, whereas activated B cells are effective accessory cells for T cell responses. *J. Immunol.*, **135**: 2937.
- KRIEGER, J.I., KARR, R.W., GREY, H.M., YU, W-Y., O'SULLIVAN, D., BATOVSKY, L., ZHENG, Z-L., COLON, S.M., GAETA, F.C.A., SIDNEY, J., ALBERTSON, M., DEL GUERCIO, M-F., CHESNUT, R.W., SETTE A. 1991. Single amino acid changes in DR and antigen define residues critical for peptide-MHC binding and T cell recognition. *J. Immunol.*, **146**: 2331-2340.
- KUIKEN, C.L., DE JONG, J.J., BAAN, E., KEULEN, W., TERSMETTE, M., GOUDSMIT, J. 1992. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J. Virol.*, **66**: 4622-4627.
- LAI, M-Z., JANG, Y-J., CHEN, L-K., GEFTER, M.L. 1990. Restricted V-(D)-J junctional regions in the T cell response to λ -repressor. Identification of residues critical for antigen recognition. *J. Immunol.*, **144**: 4851-4856.

- LAMB, C.A., CRESSWELL, P. 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. **J. Immunol.**, **148**: 3478-82.
- LANE, C.H., FAUCI, A.S. 1985. Immunological abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. **Annu. Rev. Immunol.**, **3**: 477-500.
- LANGHOFF, E., TERWILLIGER, E.F., BOS, H.J., KALLAND, K.H., POZNANSKY, M.C., BACON, O.M.L., HASELTINE, W.A. 1991. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 7998- 8002.
- LANZAVECCHIA, A. 1990. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II restricted T lymphocytes. **Annu. Rev. Immunol.**, **8**: 773-93.
- LATRON, F., PAZMANY, L., MORRISON, J., MOOTS, R., SAPER, M.A., McMICKAEL, A., STROMINGER, J.L. 1992. A critical role for conserved residues in the cleft of HLA-A2 in presentation of a nonapeptide to T-cells. **Science**, **257**: 964-966.
- LAURENT-CRAWFORD, A.G., KRUST, B., RIVIERE, Y., DESGRANGES, C., MULLER, S., KIENY, M.P., DAUGUET, C., HOVANESSIAN, A.G. 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **9**: 761-773.
- LAW, C.L., CLARK, E.A. 1994. Cell-cell interactions that regulate the development of B-lineage cells. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 238-247.
- LEDBETTER, J.A., DEANS, J.P., ARUFFO, A., GROSMAIRE, L.S., KANNER, S.B., BOLEN, J.B., SCHIEVEN, G.L. 1993. CD4, CD8 and the role of CD 45 in T-cell activation. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 334-340.
- LEDERMAN, S., YELLIN, M.J., COVEY, L.R., CLEARY, A.M., CALLARD, R., CHESS, L. 1993. Non-antigen signals for B-cell growth and differentiation to antibody secretion. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 439-444.

- LEPRINCE, C., DRAVES, K.A., LEDBETTER, J.A., GEAHLEN, R.A., CLARK, E.A. 1993. CD22 associates with the human sIgM/B cell antigen receptor complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 3236-3240.
- LETOURNEUR, F., KLAUSNER, R.D. 1992. Activation of T cells by tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3 ϵ . **Science**, **255**: 79-82.
- LEVY, J.A., HOFFMAN, A.A., KRAMER, S.L., SHIMABUKOR, J., OSHIRO, L.S. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, **225**: 840-842.
- LIE, W-R., MYERS, N.B., GORKA, J., RUBOCKI, R.J., CONNOLLY, J.M., HANSEN, T.H. 1990. Peptide ligand-induced conformation and surface expression of the L^d class I MHC molecule. **Nature**, **344**: 439.
- LINSLEY, P.S., GREENE, J.L., TAN, P., BRADSHAW, J., LEDBETTER, J.A., ANASETTI, C., DAMLE, N.K. 1992. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, **176**: 1595-1604.
- LITTMAN, D.R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. **Annu. Rev. Immunol.**, **5**: 561.
- LOTTEAU, V., TEYTON, L., PELERAUX, A., NILSSON, T., KARLSSON, L., SCHMID, S.L., QUARANTA, V., PETERSON, P.A. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. **Nature**, **348**: 600-605.
- LU, Y., TOUZJIAN, N., STENZEL, M., DORFMAN, T., SODROSKY, J. and HASELTINE, W. 1990. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. **J. Virol.**, **64**: 5226.
- LUCAS, S., MARAIS, R., GRAVES, J.D., ALEXANDER, D., PARKER, P.J., CANTRELL, D.A. 1990. Heterogeneity of protein kinase C expression and regulation in T lymphocytes. **FEBS Lett.**, **263**: 3402.
- LURIA, S., CHAMBERS, I., BERG, P. 1991. Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**: 5326.

- LYERLY, H.K., MATTHEWS, T.J., LANGLOIS, A.J., BOLOGNESI, D.P., WEINHOLD, K.J. 1987. Human T-cell lymphotropic virus IIIB 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**: 4601-4605.
- MADDEN, D.R., GORGA, J.C., STROMINGER, J.L., WILEY, D.C. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. **Nature**, **353**: 321-326.
- MAGGI, E., M. MAZZETTI, A. RAVINA, F. ANNUNZIATO, M. DE CARLI, M.P. PICCINNI, R. MANETTI, M. CARBONARI, A.M. PESCE, G. DEL PRETE, S. ROMAGNANI. 1994. Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. **SCIENCE**, **265**: 244-248.
- MAJERUS, P.W., ROSS, T.S., CUNNINGHAM, T.W., CALDWELL, K.K., BENNETT-JEFFERSON, A., BANSAL, V.S. 1990. Recent insights in phosphatidylinositol signaling. **Cell**, **63**: 459.
- MAK, T.W. 1988. The T cell receptors. New York : Plenum Press.
- MAKGOBA, M.W., MARTIN, E., SHAW, S.S. 1989. The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T cell recognition. **Immunol. Today**, **10**: 417-422.
- MALEK, S.N., DESIDERIO, S. 1993. SH2 Domains of the protein-tyrosine kinase Blk, Lyn, and Fyn(T) bind distinct sets of phosphoproteins from B lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, **268**: 22557-22565.
- MALISSEN, B., SCHMITT-VERHULST, A-M. 1993. Transmembrane signalling through the T-cell-receptor-CD3 complex. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 324-333.
- MANCA, F., FENOGLIO, D., LI PIRA, G., KUNKL, A., CELADA, F. 1991. Effect of antigen/antibody ratio on macrophage uptake, processing, and presentation to T cells of antigen complexed with polyclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, **173**: 37-48.
- 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) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. **J. Immunol.**, **138**: 2640-2644.

- MARTINEZ, C.K., MONACO, J.J. 1991. Homology of proteasome subunits to a major histocompatibility complex-linked LMP gene. **Nature**, **353**: **664-667**.
- MARTZ, E. 1987. LFA-1 and other accessory molecules functioning in adhesions of T and B lymphocytes. **Human Immunol.**, **18**: **3-37**.
- MATIS, L.A. 1990. The molecular basis of T cell specificity. **Annu. Rev. Immunol.**, **8**: **65-82**.
- MATSUI, K., BONIFACE, J.J., REAY, P.A., SCHILD, H., FAZEKAS DE ST GROTH, B., DAVIS, M.M. 1991. Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors. **Science**, **254**: **1788-1791**.
- MATSUMURA, M., FREMONT, D.H., PETERSON, P.A., WILSON, I.A. 1992. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. **Science**, **257**: **927-34**.
- McCONKEY, D.J., ORRENIUS, S., JONDAL, M. 1990. Cellular signaling in programmed cell death (apoptosis). **Immunol. Today**, **11**: **120-121**.
- McCUNE J.M., RABIN, L.B., FEINBERG, M.B., LIEBERMAN, M., KOSEK, J.C., REYES, G.R., WEISMANN, I.L. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp 160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. **Cell**, **53**: **55**.
- McDUGAL, J.S., KENNEDY, M.S., SLIGH, J.M., CORT, S.P., NICHOLSON, J.K.A. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. **Science**, **231**: **382**.
- McKAY, C.R. 1993. Immunological memory. **Adv. Immunol.**, **53**: **217-265**.
- MEYAARD, L., OTTO, S.A., JONKER, R.R., MIJNSTER, M.J., KEET, R.P.M., MIEDEMA, F. 1992. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. **Science**, **257**: **217-219**.
- MICHIE, C.A., McLEAN, A., ALCOCK, C., BEVERLEY, P.C.L. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. **Nature**, **360**: **264-265**.

- 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**: 1908-1914.
- MIEDEMA, F., TERSMETTE, M., VAN LIER, R. 1990. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. **Immunol. Today**, **11**: 293-297.
- MITTLER, R.S., HOFFMANN, M.K. 1989. Synergism between HIV gp120 and gp120-specific antibody in blocking human T cell activation. **Science**, **245**: 1380-1382.
- MIURA, T., OHTA, Y., ISHIKAWA, K., NAKAI, M., FROST, E., ROELANTS, G.E., ROFFI, J., HAYAMI, M. 1988. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. **J. Virol.**, **62**: 4044-4050.
- MOELLER, G. 1993. The B cell antigen receptor. **Immunol. Rev.**, **132**: 5-206.
- MOLLER, G. 1985. Molecular genetics of class I and II MHC antigens. **Immunol. Rev.**, **85**.
- MOLLER, G. 1988. IL-4 and IL-5: Biology and genetics. **Immunol. Rev.**, **102**.
- MOLLER, G. 1991. γ/δ T cells. **Immunol. Rev.**, **120**: 5-204.
- MOMBURG, F., NEEFJES, J.J., HAMMERLING, G.J. 1994. Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 32-37.
- MONACO, J.J., CHO, S., ATTAYA, M. 1990. Transport protein genes in the murine MHC: Possible implications for antigen processing. **Science**, **250**: 1723-1725.
- MOORE, K.W., VIEIRA, P., FIORENTINO, D.F., TROUNSTINE, M.L., KHAN, T.A., MOSMANN, T.R. 1990. Homology of cytokine

synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science, 248: 1230-1234.**

- MOSIER, D.E., GULIZIA, R.J., McISAAC, P.D., TORBETT, B.E., LEVY, J.A. 1993. Rapid loss of CD4+ T cells in human-PBL-SCID mice by noncytopathic HIV isolates. **Science, 260: 689-692.**
- MOSLEY, B., BECKMANN, M.P., MARCH, C.J. *et al.* 1989. The murine interleukin-4 receptor: Molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. **Cell, 59: 335-348.**
- MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. 1991. Role of IL-10 in cross-regulation of Th1 and Th2 responses. **Immunol. Today, 12: A49-A53.**
- MULLER, M.C., SAKSENA, N.K., NERRIENET, E., CHAPPEY, C., HERVE, V.M.A., LEGAL-CAMPODONICO, D.J.P. & P., LANG, M.C., DIGOUTTE, J.P., GEORGES, A.G., SONIGO, G.-C.M.C. & P., BARRE-SINOUSSI, F. 1993. Simian immunodeficiency viruses from central and western africa: Evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys. **J. Virol., 67: 1227-1235.**
- NEEFJES, J.J., PLOEGH, H.L. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. **Immunol. Today, 13: 179-184.**
- NISHIZUKA, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. **Nature, 308: 693.**
- NISHIZUKA, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulations. **Nature, 334: 661.**
- NOELLE, R.J., LEDBETTER, J.A., ARUFFO, A. 1992. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. **Immunol. Today, 13: 431-433.**
- NOELLE, R.J., ROY, M., SHEPHERD, D.M., STAMENKOVIC, I., LEDBETTER, J.A., ARUFFO, A. 1992. A 39-kDa protein on activated Helper T cells binds CD40 and transduces the signal for cognate activation of B cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 6550-6554.**
- NORTON, F.L., DAVIS, G.B., JONES, P.P., GOODMAN, J.W. 1989. ARSONATE-SPECIFIC MURINE T CELL CLONES. V. Antigen presentation by L-cells transfected with normal and mutant class II genes. **J. Immunol., 143: 446-451.**

- O'BRIEN, W.A., KOYANAGI, Y., NAMAZIE, A., ZHAO, J.-Q., DIAGNE, A., IDLER, K., ZACK, J.A., CHEN, I.S.Y. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. **Nature**, **348**: 69-73.
- O'GARRA, A., MURPHY, K. 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 458-466.
- O'SULLIVAN, D., ARRHENIUS, T., SIDNEY, J., DEL GUERICO, M.F., ALBERTSON, M., WALL, M., OSEROFF, C., SOUTHWOOD, S., COLON, S.M., GAETA, F.C.A..1991. On the Interaction of promiscuous antigenic peptides with different DR alleles. Identification of common structural motifs. **J. Immunol.**, **147**: 2663-2669.
- O'SULLIVAN, D., SIDNEY, J., DEL GUERICO, M-F., COLON, S.M., SETTE, A. 1990. Truncation analysis of several DR binding epitopes. **J. Immunol.**, **146**: 1240-1246.
- OSWALD, I.P., GAZZINELLI, R.T., SHER, A., JAMES, S.L. 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. **J. Immunol.**, **148**: 3578-3582.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., DEMAREST, J.F., BUTINI, L., MONTRONI, M., FOX, C.H., ORENSTEIN, J.M., KOTLER, D.P. FAUCI, A.S. 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. **Nature**, **362**: 355-358.
- PARHAM, P. 1990. Peptide feeding and cellular cookery. **Nature**, **346**: 793.
- PARNES, J.R., 1989. Molecular biology and function of CD4 and CD8. **Adv. Immunol.**, **44**: 265.
- PASCUAL, V., CAPRA, J.D. 1991. Human immunoglobulin heavy chain variable region genes: organization, polymorphism and expression. **Adv. Immunol.**, **49**: 1-74.
- PEAKER, C.J.G. 1994. Transmembrane signalling by the B-cell antigen receptor. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 359-363.

- PERARNAU, B., SIEGRIST, C-A., GILLET, A., VINCENT, C., KIMURA, S., LEMONNIER, F.A. 1990. β_2 -Microglobulin restriction of antigen presentation. **Nature**, **346**: 751.
- PETERS, P.J., NEEFJES, J.J., OORSCHOT, V., PLOEGH, H.L., GEUZE, H.J. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. **Nature**, **349**: 669-676.
- POWIS, S.H., MOCKRIDGE, I., KELLY, A., KERR, L.A., GLYNNE, R., GILEADI, U., BECK, S., TROWSDALE, J. 1992. Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 1463-1467.
- PUTNEY, S.D., Mc KEATING, J.A. 1990. Antigenic variation in HIV. **AIDS**, **4**(suppl 1); S129.
- QUESNIAUX, V.F.J. 1992. Interleukins 9, 10, 11 and 12 and kit ligand: a brief overview. **Res. Immunol.**, **143**: 385-400.
- RABSON, A.B., MARTIN, M.A. 1985. Molecular organization of the AIDS retrovirus. **Cell**, **40**: 477.
- RAMMENSEE, H.G., FALK, K. ROTZSCHKE, O. 1993. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. **Annu. Rev. Immunol.**, **11**: 213-244.
- RETH, M. 1994. B cell antigen receptors. **Current Opinion Immunol.**, **6**: 3-8.
- ROBERTSON, M. 1991. Antigen processing: proteasomes in the pathway. **Nature**, **353**: 300-301.
- ROBINSON, P.J. 1991. Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation. **Immunol. Today**, **12**: 35-41.
- ROCHE, P.A., MARKS, M.S., CRESSWELL, P. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. **Nature**, **354**: 392-394.
- ROCK, K.L., GAMBLE, S., ROTHSTEIN, L., GRAMM, C., BENACERRAF, B. 1991. Dissociation of β_2 -microglobulin leads to the

accumulation of a substantial pool of inactive class I MHC heavy chains on the cell surface. **Cell**, **65**: **611-620**.

- ROHREN, E.M., PEASE, L.R., PLOEGH, H.L., SCHUMACKER, T.N.M. 1993. Polymorphisms in pockets of major histocompatibility complex class I molecules influence peptide preference. **J. Exp. Med.**, **177**: **1713-1721**.
- ROMAGNOLI, P., LAYET, C., YEWDELL, J., BAKKE, O., GERMAIN, R. 1993. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. **J. Exp. Med.**, **177**: **583-596**.
- ROTHBARD, J.B., LECHLER, R.I., HOWLAND, K., BAL, V., ECKELS, D.D., SEKALY, R., LONG, E.O., TAYLOR, W.R., LAMB, J.R. 1988. Structural model of HLA-DR1 restricted T cell antigen recognition. **Cell**, **52**: **515-523**.
- ROTZSCHKE, O., FALK, K. 1991. Naturally-occurring peptide antigens derived from the MHC class-I-restricted processing pathway. **Immunol. Today**, **12**: **447-456**.
- ROTZSCHKE, O., FALK, K. 1994. Origin, structure and motifs of naturally processed MHC class II ligands. **Current Opinion Immunol.**, **6**: **45-51**.
- RUDD, C.E., JANSSEN, O., CAI, Y-C., DA SILVA, A.J., RAAB, M., PRASAD, K.V.S. 1994. Two-step TCR ζ /CD3-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains, protein-tyrosine and lipid kinases. **Immunol. Today**, **15**: **225-234**.
- RUDENSKY, A.Y., PRESTON-HURLBURT, P., AL-RAMAKI, B.K., ROTHBARD, J., JANEWAY, C.A. Jr. 1992. Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggests sequence motifs. **Nature**, **359**: **429-431**.
- RUDENSKY, A.Y., PRESTON-HURLBURT, P., HONG, S.C., BATLOW, A., JANEWAY Jr C.A. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. **Nature**, **353**: **622-627**.
- SADEGH-NASSERI, S., GERMAIN, R.N. 1992. How MHC class II molecules work: peptide dependent completion of protein folding. **Immunol. Today**, **13**: **43-46**.

- SAIZAWA, K., ROJO, J., JANEWAY, C.A. 1987. Evidence for a physical association of CD4 and the CD3: α : β T cell receptor. **Nature**, **328:260**.
- SAKAGUCHI, N., MATSUO, T., NOMURA, J., KUWAHRA, K., IGARASHI, H., INUI, S. 1993. Immunoglobulin receptor-associated molecules. **Adv. Immunol.**, **54: 337-392**.
- SANCHEZ, M., MISULOVIN, Z., KURHARDT, A., MAHAJAN, S., COSTA, T., FRANKE, R., BOLEN, J., NUSSENZWEIG, M. 1993. Signal transduction by immunoglobulin is mediated through Ig- α and Ig- β . **J. Exp. Med.**, **178: 1049-1055**.
- SANT, A.J., MILLER, J. 1994. MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. **Current Opinion Immunol.**, **6: 57-63**.
- SASAZUKI, T., NISHIMURA, Y., MUTO, M., OHTA, N. 1983. HLA linked genes controlling immune response and disease susceptibility. **Immunol. Rev.**, **70: 51-76**.
- SATTENTAU, Q. J., WEISS, R.A. 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. **Cell**, **52: 631-635**.
- SCHATZ, D.G., OETTINGER, M.A., SCHLISSEL, M.S. 1992. V(D)J recombination: Molecular biology and regulation. **Annu. Rev. Immunol.**, **10**.
- SCHMITT, D., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., STAQUET, M.J., THIVOLET, M-J. 1989. La cellule de Langehans. Cellule dendritique de l'épiderme et des muqueuses. **Médecine/sciences**, **5: 103-111**.
- SCHNITTMAN, S.M., DENNING, S.M., GREEHOUSE, 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: 7727-7731**.
- SCHUITEMAKER, H., KOOT, M., KOOSTRA, N.A., LANGE, J.M.A., SCHATTENKERK, J.K.M., MIEDEMA, F., TERSMETTE, M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at

different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from moncytotropic to T-cell tropic virus populations. **J. Virol.**, **66**: 1354.

- SCHULTE, R.J., CAMPBEL, M.A., FISHER, W.H., SEFTON, B.M. 1992. Tyrosine phosphorylation of CD22 during B cell activation. **Science**, **258**: 1001-1004.
- SCHWARTZ, R.H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. **Cell**, **71**: 1065-1067.
- SCHWARTZ, S., FELBER, B.K., FENYO, E.-M., PAVLAKIS, G.N. 1989. Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T-cell and monocyte cell lines. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 7200-7203.
- SCOLLAY, R., SHORTMAN, K. 1985. Cell traffic in the adult thymus: Cell entry and exit, cell birth and death. In **Recognition and Regulation in Cell-mediated Immunity**, edited by Watson, J.D., Marbrook, J. New York, pp: 3-30.
- SCOTT, P. Selective differentiation of CD4⁺ T helper cell subsets. 1993. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 391-397.
- SEDER, R.A., GAZZINELLI, R., SHER, A., PAUL, W.E. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ cells to enhance priming for Interferon γ Production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 10188-10192.
- SEED, B., ARUFFO, A. 1987. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 3365-3369.
- SHIMIZU, A., HONJO, T. 1984. Immunoglobulin class switching. **Cell**, **36**: 801.
- SHIODA, T., LEVY, J.A., CHENG-MAYER, C. 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T cell line and macrophage tropisms of human immunodeficiency virus type 1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 9434-9438.

- SILBERBERG-SINAKIN, I., GIGLI, I., BAER, R.L., THORBACKE, G.J. 1980. Langerhans' cells: Role in contact hypersensitivity and relationship to lymphoid dendritic cells and to macrophages. **Immunol. Rev.**, **53**: 203-232.
- SIMON, M.I., STRATHMANN, M.P., GAUTAM, N. 1991. Diversity of G-proteins in signal transduction. **Science**, **252**: 802.
- SMITH, K.A. 1988. Interleukin-2: Inception, impact and implications. **Science**, **240**: 1169-1176.
- SNAPPER, C.M., MOND, J.J. 1993. Towards a comprehensive view of immunoglobulin class switching. **Immunol. Today**, **14**: 15-17.
- SODROSKI, J., GOH, W.C., ROSEN, C., TARTAR, A., PORTETELLE, D., BURNY, A., HASELTINE, W. 1986. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with *sor* gene deletions. **Science**, **231**: 1549-1553.
- 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.
- SODROSKI, J., GOH, W.C., ROSEN, C., DAYTON, A., TERWILLIGER, E., HASELTINE, W. 1986. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. **Nature**, **321**: 412-417.
- SORGER, S.B., PATERSON, Y., FINK, P.J., HEDRICK, S.M. 1990. T cell receptor junctional regions and the MHC molecule affect the recognition of antigenic peptides by T cell clones. **J. Immunol.**, **144**: 1127-1135.
- SORNASSE, T., FLAMAND, V., DE BECKER, G., BAZIN, H., TIELEMANS, K., URBAIN, J., LEO, O., MOSER, M. 1992. Antigen pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response *in vivo*. **J. Exp. Med.**, **175**: 15-21.
- SPRENT, J. 1990. ED: The thymus and T cell differentiation. **Semin. Immunol.**, **2**: 1-86.
- SPRENT, J. 1993. Lifespans of naive, memory and effector lymphocytes. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 433-438.

- SPRINGER, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, **346**: 425-434.
- STAMENKOVIC, I., SGROI, D., ARUFFO, A., SU, M.S., ANDERSON, T. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialytransferase, CD75, on B cells. **Cell**, **66**: 1133-1144.
- STEINMAN, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, **9**: 271-296.
- STEVENSON, M., STANWICK, T.L., DEMPSEY, M.P., LAMONICA, C.A. 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. **EMBO J.**, **9**: 1551.
- STOUT, R.D. 1993. Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. **Current Opinion Immunol.**, **5**: 398-403.
- STREBEL, K., DAUGHERTY, D., CLOUSE, K., COHEN, D., FOLKS, T., MARTIN, M.A. 1987. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. **Nature**, **328**: 728-730.
- SYPEK, J.P., CHUNG, C.L., MAYOR, S.E.H., SUBRAMANYAM, J.M., GOLDMAN, S.J., SIEBURTH, D.S., WOLF, S.E., SCHAUB, R.G. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: Interleukin 12 initiates a protective T Helper Type 1 immune response. **J. Exp. Med.**, **177**: 1797-1802.
- SZAKAL, A.K., KOSCO, M.H., TEW, J.G. 1988. A novel in vivo follicular dendritic cell-dependent iccosome-mediated mechanism of delivery of antigen to antigen-processing cells. **J. Immunol.**, **140**: 341.
- TAINER, J.A., GETZOFF, E.D., PATERSON, Y., OLSON, A.J., and LERNER, R.A. 1985. The atomic mobility component of protein antigenicity. **Ann. Rev. Immunol.**, **3**, 501.
- TAYLOR, A.H., HABERMAN, A.M., GERHARD, W., CATON, A.J. 1990. Structure-function relationships among highly diverse T cells that recognize a determinant from influenza virus hemagglutinin. **J. Exp. Med.**, **172**: 1643-1651.
- TAYLOR, S.S. 1989. cAMP dependent protein kinase. Model for an enzyme family. **J. Biol. Chem.**, **246**: 8443.

- TERAI, C., KORNBLUTH, R.S., PAUZA, C.D., RICHMAN, D. D., 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.
- TERSMETTE, M., GRUTERS, R.A., DE WOLF, F. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. **J. Virol.**, **63**: 2118.
- TEW, J.G., KOSCO, M.H., BURTON, G.F., SZAKAL, A.K. 1990. Follicular dendritic cells as accessory cells. **Immunol. Rev.**, **117**: 185.
- TEW, J.G., PHIPPS, R.P., MANDEL, T.E. 1980. The maintenance and regulation of the humoral immune response: Persisting antigen and the role of follicular antigen-binding dendritic cells as accessory cells. **Immunol. Rev.**, **53**: 175-201.
- TEYTON, L., PETERSON, P. 1992. Invariant chain - a regulator of antigen presentation. **Trends Cell Biol.**, **2**: 52-56.
- THOMAS, M.L. 1989. The leukocyte common antigen family. **Annu. Rev. Immunol.**, **7**: 339-369.
- TOWNSEND, A., BODMER, H. 1989. Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes. **Annu. Rev. Immunol.**, **7**: 601-24.
- TROWSDALE, J., HANSON, I., MOCKRIDGE, I., BECK, S., TOWNSEND, A., KELLY, A. 1990. Sequences encoded in the class-II region of the MHC related to the ABC superfamily transporters. **Nature**, **348**: 741-743.
- TRUITT, T., DESAI, B., PODLASKI, F., WOLITZKY, A., QUINN, P., STERN, A., GATELY, R., CHIZZONITE, R. 1991. Initial characterization of the receptor for cytotoxic lymphocyte maturation factor (CLMF) on PHA-activated human peripheral blood lymphoblasts (PHA-PBL). **J. Cell. Biochem.**, **15F**: 120.
- TSUJIMOTO, H., COOPER, R.W., KODAMA, T., FUKASAWA, M.,
- URBAN, R.G., CHICZ, R.M., VIGNALI, D.A.A., STROMINGER, J.L. 1993. The dichotomy of peptide presentation by class I and class II MHC

proteins. In: Sette, A.: **Naturally Processed Peptides.** Chem. Immunol. Basel, Karger, 57: 197-234.

- UYTTEHOVE, C., SIMPSON, R.J., AND VAN SNICK, J. 1988. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci., 85:** 6934-6938.
- VALENTINE, M.A., LICCIARDI, K.A. 1992. Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40. **Eur. J. Immunol., 22:** 3141-3148.
- VAN ROOIJEN, N. 1990. Antigen processing and presentation in *vivo*: the microenvironment as a crucial factor. **Immunol. Today, 11:** 436-439.
- VARMUS, H. 1988. Retroviruses. **Science, 240:** 1427.
- VEILLETTE, A., BOOKMAN, M.A., HORAK, E.M., BOLEN, J.B. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. **Cell, 55:** 301.
- 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:** 1606-1608.
- VON BOEHMER, H. 1992. Thymic selection: a matter of life and death. **Immunol. Today, 13:** 454-458.
- WAIN-HOBSON, S., SONIGO, P., DANOS, O., COLE, S., ALIZON, M. 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. **Cell, 40:** 9.
- WALDMANN, T.A. 1989. The multi-subunit interleukin-2 receptor. **Annu. Rev. Biochem., 58:** 875-911.
- WATKINS, B.A., DORN, H.H., KELLY, W.B., ARMSTRONG, R.C., POTTS, B.J., MICHAELS, F., KUFTA, C.V., DUBOIS-DALCQ, M. 1990. Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures. **Science, 249:** 549-553.
- WEBER, S., TRAUNECKER, A., OLIVERI, F., GERHARD, W., KARJALAINEN K. 1992. Specific low-affinity recognition of major

histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. **Nature**, **356**: 793-795.

- WEGENER, A.M.K., LETOURNEUR, F., HOEVELER, A. BROCKER, T., LUTON, F., MALISSEN, B. 1992. The T cell receptor/CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. **Cell**, **68**: 83-95.
- WEISS, A. 1990. Structure and function of the T cell antigen receptor. **J. Clin. Invest.**, **86**: 1015.
- WEISS, A. 1991. Molecular and genetic insights into T cell antigen receptor structure and function. **Annu. Rev. Genet.**, **25**: 487-510.
- WEISS, R.A. 1993. How does HIV cause AIDS. **Science**, **260**: 1273.
- WERSTERVELT, P., TROWBRIDGE, D.B., EPSTEIN, L.G., BLUMBERG, B.M., LI, Y., HAHN, B.H., SHAW, G.M., PRICE, R.W., RATNER, L. 1992. Macrophage tropism determinants of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. **J. Virol.**, **66**: 2577-2582.
- WILLEY, R.L., MALDARELLI, F., MARTIN, M.A., STREBEL, K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces rapid degradation of CD4. **J. Virol.**, **66**: 7193-7200.
- WILLEY, R.L., RUTLEDGE, R.A., DIAS, S., FOLKS T., THEODORE, T., BUCKLER, C.E., MARTIN, M.A. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **83**: 5038.
- WOLF, S.F., TEMPLE, P.A., KOBAYASHI, M., YOUNG, D., DICIG, M., LOWE, L., DZIALO, R., FITZ, L., FERENZ, C., HEWICK, R.M., KELLEHER, K., HERMANN, S.H., CLARK, S.C., AZZONI, L., CHAN, S.H., TRINCHIERI, G., PERUSSIA, B. 1991. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **J. Immunol.**, **146**: 3074-3081.
- 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.

- YANAGI, Y., *et al.* 1984. A human T cell specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. **Nature**, **308**, **145-149**.
- YOKOTA, T., ARAI, N., DeVRIES, J. 1988. Molecular biology of interleukin 4 and interleukin 5 genes and biology of their products that stimulate B cells, T cells and hemopoietic cells. **Immunol. Rev.**, **102**: **137-187**.
- ZAGURI, D., 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**: **850-853**.

